

Rekombinante Antikörper für die *Point-of-care*-Diagnostik von CRP

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von David Fröde
aus Erfurt

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	16.05.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	13.07.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Fröde, D.; Balck, A.; Michalzik, M.; Hust, M.; Büttgenbach, S. & Dübel, S. (2012)
Microchips for protein analytics and diagnostics. In: From gene to product – Development of biotechnological processes by integrating genetic and engineering methods. Ed: Jahn, D., Krull, R. & Wittmann, C. Cuvillier-Verlag. Göttingen, ISBN 978-3-95404-135-0, pp. 247-265

Tagungsbeiträge

Fröde, D.; Balck, A.; Dübel, S.; Büttgenbach, S.
Microfluidic Antibody Lab-on-chips. (Poster)
Lab-on-a-chip World Congress 2011, South San Francisco, CA, USA

Fröde, D.; Al-Halabi, L.; Balck, A.; Hust, M.; Büttgenbach, S.; Dübel, S.
Microfluidic Antibody Lab-on-chips. (Poster)
VAAM-Jahrestagung 2009, Bochum, Deutschland

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
I EINLEITUNG	1
I.1 Aufbau und Funktion von Antikörpern	1
I.2 Rekombinante Antikörperfragmente	3
I.3 Antikörper-Phagen-Display-Technologie	5
I.3.1 Bakteriophage M13	5
I.3.2 Phagen-Display	6
I.3.3 Antikörpergenbibliotheken	7
I.3.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning)	8
I.4 Veränderung der biochemischen Eigenschaften von Antikörperfragmenten.	9
I.5 C-reaktives Protein (CRP)	12
I.6 Lab-on-a-Chip	15
I.7 Zielsetzung	17
II MATERIAL	19
II.1 Geräte und technische Anlagen.	19
II.2 Verbrauchsmaterialien.	20
II.3 Chemikalien und Reagenzien	21
II.4 Puffer und Lösungen	22
II.5 Nährmedien und Zusätze	25
II.5.1 Prokaryotische Kultivierung.	25
II.5.2 Eukaryotische Kultivierung	26
II.6 Verwendete Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien	26
II.7 Antikörpergenbibliotheken	27
II.8 Plasmide	27
II.9 Oligodesoxynukleotide.	29
II.10 Enzyme	31
II.11 Antigene und Antikörper	31
II.12 Software	32
III METHODEN	33
III.1 Mikrobiologische Methoden.	33
III.1.1 Sterilisation	33
III.1.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	33
III.1.2.1 Plattenkulturen	33
III.1.2.2 Flüssigkulturen.	33
III.1.3 Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Zellen	33
III.1.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen.	33
III.1.5 Herstellung chemo-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.	34
III.1.6 Transformation mittels Hitzeschock	34
III.1.7 Herstellung von M13-Phagen	34
III.1.8 Selektion mit Antikörperphagen-Bibliotheken	35
III.1.8.1 Panning auf Stripes.	35
III.1.8.2 Panning auf Beads	36

III.1.9	Amplifikation von Antikörperphagen mittels <i>High-throughput screening</i> (HTS)-Protokoll	36
III.1.10	Titerbestimmung von M13K07-Antikörper-Phagen	37
III.1.11	Produktion von löslichen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten	37
III.1.12	Produktion von scFv-Fragmenten in Schüttelkolben	38
III.1.13	Produktion von scFv-Fragmenten im LEX®-Bioreaktor	38
III.2	Molekularbiologische Methoden	39
III.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	39
III.2.2	Amplifikation von DNA	39
III.2.2.1	Standard-PCR	39
III.2.2.2	Kolonie-PCR	40
III.2.2.3	Nested-error-prone-PCR	40
III.2.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	41
III.2.4	Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	41
III.2.5	Enzymatische Restriktion von DNA	41
III.2.6	DNA-Dephosphorylierung	41
III.2.7	Agarosegelelektrophorese	42
III.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	42
III.2.9	Sequenzierung	42
III.3	Biochemische Methoden	43
III.3.1	Präparation von scFv-Fragmenten aus dem Periplasma von <i>Escherichia coli</i>	43
III.3.2	Präzipitation von scFv-Fragmenten aus dem Kulturüberstand von <i>Escherichia coli</i>	43
III.3.3	Dialyse	43
III.3.4	Analyse der rekombinanten Proteinproduktion	43
III.3.5	IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten	44
III.3.6	Protein-A-Reinigung von scFv-Fc-Fragmenten über Profinia	44
III.3.7	SDS-PAGE	45
III.3.8	Coomassie®-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	45
III.3.9	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	45
III.3.10	Western Blot	46
III.3.11	Immunfärbung	46
III.3.12	Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
III.3.12.1	Antigen-ELISA auf MTP	46
III.3.12.2	ELISA auf Beads	47
III.3.13	Quantifizierung von Proteinen	47
III.3.13.1	Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	47
III.3.13.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA	48
III.3.14	Überprüfung der SNAP-Tag-Aktivität	48
III.3.15	Kopplung von CRP an magnetische <i>Beads</i>	48
III.4	Zellbiologische Methoden	49
III.4.1	Kultivierung von HEK293-6E-Zellen	49
III.4.2	Transfektion von HEK293-6E-Zellen	49
III.5	Biophysikalische Methoden	50
III.5.1	Größenausschlusschromatographie	50
III.5.2	Bestimmung der Bindungskinetiken von scFv-Fragmenten	50
III.5.3	Bestimmung der Bindungskinetiken von scFv-hIgG1Fc-Antikörpern	50
III.5.4	Bestimmung der Affinität von scFv-SNAP-Fusionsproteinen	51
III.5.5	Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über SAM	51
III.5.6	Messungen von Antigenen aus einer Lösung mit einer Quarzkristallmikrowaage	51

IV	ERGEBNISSE	53
IV.1	Erstellung von scFv-C _κ /C _λ -Antikörperfragmenten.	54
IV.1.1	Konstruktion von scFv-C _κ /C _λ -Expressionsvektoren	54
IV.1.2	Produktion verschiedener scAb- und scFv-Fragmente	54
IV.1.3	Aktivitätsanalyse der scAb- und scFv-Fragmente	55
IV.2	Panning mit Carboxy-Beads gegen CRP unter Verwendung vier unterschiedlicher Antikörperphagen-Bibliotheken	56
IV.2.1	Selektion von CRP-spezifischen Antikörper-Fragmenten	56
IV.2.2	Proteinbiochemische Analyse CRP-spezifischer scFv-Fragmente	57
IV.2.2.1	Nachweis der spezifischen CRP-Bindung neu identifizierter scFv-Fragmente.	58
IV.2.2.2	Analyse des Aggregationsverhaltens neu identifizierter scFv-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie	60
IV.2.2.3	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K _D) neu identifizierter scFv-Fragmente	61
IV.2.2.4	Bestimmung der Epitopkonformation der neu identifizierten scFv-Fragmente	62
IV.3	Mutagenisierte Antikörpergenbibliotheken	63
IV.3.1	Erstellung der mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ mittels <i>Nested-error-prone</i> -PCR.	63
IV.3.2	Evaluierung der mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ . . .	65
IV.3.3	Selektion von CRP-spezifischen Antikörperphagen unter Verwendung mutagenisierter Antikörperphagen-Bibliotheken	66
IV.3.4	Proteinbiochemische Analysen mutagenisierter scFv-Fragmente.	68
IV.3.5	Titrationen-ELISA mit gereinigten scFv-Fragmenten	70
IV.3.6	Bestimmung der Epitopkonformation mutagenisierter scFv-Fragmente	71
IV.3.7	Stabilitätsanalyse mutagenisierter scFv-Fragmente	72
IV.3.8	Analyse des Aggregationsverhaltens mutagenisierter scFv-Fragmente mittels SEC	73
IV.3.9	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K _D) CRP-spezifischer scFv-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	74
IV.3.10	Konvertierung mutagenisierter scFv-Fragmente in bivalente humane Antikörperfragmente	75
IV.3.10.1	Produktion und Reinigung von scFv-hlgG1Fc-Antikörpern.	75
IV.3.10.2	Titrationen-ELISA mit gereinigten scFv-hlgG1Fc-Antikörpern.	76
IV.3.10.3	Größenausschlusschromatographie von scFv-hlgG1Fc-Antikörpern.	77
IV.3.10.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K _D) von scFv-hlgG1Fc-Antikörpern.	78
IV.4	Optimierung der Bindung von Antikörperfragmenten an Goldoberflächen.	79
IV.4.1	Produktion von scFv-SNAP-Fusionsproteinen	79
IV.4.2	Nachweis der spezifischen CRP-Bindung und SNAP-Aktivität.	80
IV.4.3	CRP-Messung mittels SNAP-gekoppelter scFv-Fragmente im <i>BIAcore2000</i> TM -System	81
IV.5	Charakterisierung und Evaluierung des Quarzkristallmikrowaagen-Sensors mit Hilfe verschiedener Antikörperfragmente	83
IV.5.1	Messung von CRP aus einer Lösung mit einem Quarzkristallmikrowaagen-Sensor	83
IV.5.2	Messungen von Lysozym aus einer Lösung mit einem Quarzkristallmikrowaagen-Sensor	90

V	DISKUSSION	93
V.1	Fusion von scFv-Antikörperfragmenten an C_{κ}/C_{λ}	95
V.2	Neue Selektionen unter veränderten Rahmenbedingungen	96
V.3	Mutagenisierte Antikörperphagen-Bibliotheken	99
V.4	Verbesserung der CRP-Detektion durch gerichtete Immobilisierung von Antikörperfragmenten mittels SNAP-Tag	104
V.5	Charakterisierung und Evaluierung des Quarzkristallmikrowaagen-Sensors mit Hilfe verschiedener Antikörperfragmente	106
V.6	Ausblick	112
VI	ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	113
VI.1	Zusammenfassung	113
VI.2	Summary.	114
VII	LITERATURVERZEICHNIS	115
A	ANHANG	131
	Vektorkarten	131
	DANKSAGUNG	137

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung I.1:	Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers	2
Abbildung I.2:	Schematischer Aufbau verschiedener Antikörperformate	4
Abbildung I.3:	Schematische Darstellung des M13-Bakteriophagen	5
Abbildung I.4:	Schematische Darstellung eines M13-Antikörperphagen und des Phagemids pHAL14 . .	7
Abbildung I.5:	Schematische Darstellung der Antikörperphagen-Selektion (Panning)	9
Abbildung I.6:	Kristallstruktur von humanem C-reaktivem Protein in Interaktion mit Phosphocholin. .	12
Abbildung IV.1:	Nachweis der Produktion verschiedener scAb/scFv-Fragmente	55
Abbildung IV.2:	Nachweis der CRP-spezifischen Aktivität verschiedener scAb- bzw. scFv-Fragmente. . .	55
Abbildung IV.3:	Nachweis der CRP-spezifischen Erkennung neu identifizierter scFv-Fragmente	58
Abbildung IV.4:	Nachweis der Bindung von nativem CRP mittels Sandwich-ELISA	59
Abbildung IV.5:	Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-Fragmente	60
Abbildung IV.6:	Affinitätsbestimmung neu identifizierter scFv-Fragmente mittels SPR	61
Abbildung IV.7:	Nachweis zur Erkennung konformationeller Epitope neu isolierter scFv-Fragmente . . .	62
Abbildung IV.8:	Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ nach <i>Error-prone</i> -PCR.	64
Abbildung IV.9:	Schematische Darstellung der Klonierung von Antikörpergenbibliotheken	64
Abbildung IV.10:	Qualität der Verpackung mutagenisierter Antikörpergenbibliotheken	65
Abbildung IV.11:	Nachweis der spezifischen Bindung der Antikörperphagen an CRP	66
Abbildung IV.12:	Identifizierung CRP-spezifischer monoklonaler scFv-Fragmente	67
Abbildung IV.13:	IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten nach der Produktion im LEX®-Bioreaktor	69
Abbildung IV.14:	Nachweis der spezifischen CRP-Bindung mutagenisierter LA13-IIE3-Derivate	70
Abbildung IV.15:	Nachweis zur Erkennung konformationeller Epitope mutagenisierter scFv-Fragmente .	71
Abbildung IV.16:	Stabilitätstests gereinigter LA13-IIE3-Derivate.	72
Abbildung IV.17:	Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-Fragmente	73
Abbildung IV.18:	Affinitätsbestimmung mutagenisierter scFv-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	74
Abbildung IV.19:	Nachweis der spezifischen CRP-Bindung von scFv-Fc-Antikörpern.	76
Abbildung IV.20:	Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-hlgG1Fc-Antikörper.	77
Abbildung IV.21:	Affinitätsbestimmung von scFv-hlgG1-Fc-Antikörpern mittels SPR	78
Abbildung IV.22:	Produktion und Reinigung von scFv-SNAP-Fusionsproteinen	79
Abbildung IV.23:	Nachweis der spezifischen CRP-Bindung gereinigter scFv-SNAP-Fusionsproteine	80
Abbildung IV.24:	Nachweis der SNAP-Aktivität des LA13-IIE3-SNAP-Fusionsproteins	80
Abbildung IV.25:	Nachweis der CRP-Detektion mittels SPR	81
Abbildung IV.26:	Nachweis der Bindung von nativem CRP mittels Sandwich-ELISA	82
Abbildung IV.27:	Spezifische QCM-Messung von CRP mit Hilfe des LA13-IIE3-scFv-Fragments	84
Abbildung IV.28:	Spezifische QCM-Messung von CRP mit Hilfe des DF39-E1-scFv-Fragments.	84
Abbildung IV.29:	Korrelation der Frequenzänderungen (Δf) mit den zu bestimmenden CRP- Konzentrationen	85

Abbildung IV.30: Abhängigkeit der gemessenen Frequenzunterschiede von der Anzahl der Wiederholungen.	86
Abbildung IV.31: Spezifische QCM-Messungen von CRP und Analyse mit Hilfe verschiedener TOB5-D4-Antikörperfragmente	87
Abbildung IV.32: Spezifische QCM-Messung von CRP und Analysen mit Hilfe des Antikörperfragments TOB5-D4-scFv	88
Abbildung IV.33: Spezifische QCM-Messungen von Lysozym und Analysen mit Hilfe des α -Lysozym scFv-Fragments D1.3	90
Abbildung IV.34: Spezifische QCM-Messung von Lysozym aus Fetalem Kälberserum (FCS) mit Hilfe des α -Lysozym scFv-Fragments D1.3	91
Abbildung A.1: Vektorkarte des Phagemids pHAL14-scFv	131
Abbildung A.2: Vektorkarte des Phagemids pIT2-scFv.	132
Abbildung A.3: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE101-XP.	133
Abbildung A.4: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE107-XP.	134
Abbildung A.5: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE-SNAP-XP	135
Abbildung A.6: Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP	136

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle II.1:	Geräte und technische Anlagen unter Angabe des Models und Herstellers.	19
Tabelle II.2:	Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Typs und Herstellers	20
Tabelle II.3:	Chemikalien und Kits und zugehörige Hersteller	21
Tabelle II.4:	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	22
Tabelle II.5:	Medien für die prokaryotische Kultivierung	25
Tabelle II.6:	Supplemente für die prokaryotische Kultivierung	26
Tabelle II.7:	Medien für die eukaryotische Kultivierung	26
Tabelle II.8:	Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien mit Beschreibung und Referenz. . . .	26
Tabelle II.9:	Antikörperbibliotheken mit Beschreibung und Referenz	27
Tabelle II.10:	Plasmide mit Beschreibung und Referenz.	27
Tabelle II.11:	Oligodesoxynukleotide mit Sequenz und Beschreibung.	29
Tabelle II.12:	Enzyme unter Angabe des Herstellers	31
Tabelle II.13:	Antigene mit Bezeichnung sowie Angabe des Herstellers	31
Tabelle II.14:	Antikörper mit Bezeichnung sowie Angabe des Herstellers	31
Tabelle II.15:	Software unter Angabe des Anbieters und der Verwendung	32
Tabelle III.1:	Zusammensetzung und Temperaturprofil der Standard-PCR	39
Tabelle III.2:	Zusammensetzung und Temperaturprofil der Kolonie-PCR	40
Tabelle III.3:	Zusammensetzung und Temperaturprofil der <i>Error-prone</i> -PCR.	40
Tabelle III.4:	Zusammensetzung eines Restriktionsverdau	41
Tabelle III.5:	Zusammensetzung der Ligationsansätze	42
Tabelle III.6:	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für eine diskontinuierliche SDS-PAGE	45
Tabelle IV.1:	Übersicht über die eluierten Phagen	56
Tabelle IV.2:	Bioinformatische Analyse neu isolierter CRP-Binder	57
Tabelle IV.3:	Proteinkonzentrationen der neu identifizierten gereinigten scFv-Fragmente	58
Tabelle IV.4:	Bestimmung der Affinität des scFv-Fragments IsP26-G1 zu CRP	61
Tabelle IV.5:	Übersicht über die mutagenisierten Antikörperbibliotheken.	65
Tabelle IV.6:	Übersicht über CRP-spezifische monoklonale Binder	68
Tabelle IV.7:	Proteinkonzentrationen der gereinigten scFv-Fragmente	69
Tabelle IV.8:	Bestimmung der Affinität der scFv-Fragmente zu CRP	75
Tabelle IV.9.:	Proteinkonzentrationen gereinigter scFv-hIgG1Fc-Antikörper	75
Tabelle IV.10:	Bestimmung der Affinität der scFv-hIgG1Fc-Antikörper zu CRP.	78
Tabelle IV.11:	Übersicht der für QCM-Messungen verwendeten Antikörperfragmente.	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	anti
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
\varnothing	Durchmesser
2×YT	2×Yeast-Tryptone-Medium
2×YT-AK	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Ampicillin und Kanamycin
2×YT-GA	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Glukose und Ampicillin
2×YT-SA	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Saccharose und Ampicillin
2×YT-T	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Tetrazyklin
A	Ampere
AE	Absorptionseinheit
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASF	Ammoniumsulfatfällung
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDR	<i>complementarity determining region</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
C_H	konstante Domäne der schweren Antikörper-Kette
CIP	Alkaline Phosphatase (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
C_L	konstante Domäne der leichten Antikörper-Kette
CRP	humanes C-reaktives Protein
Da	Dalton
dH_2O	destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1,2-Dichlorethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment constant/cristallizable</i>
FT	<i>flow through</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
GPF	Gesamtproteinfraktion
g	Gramm
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde (<i>hour</i>)
HAL	<i>human antibody library</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin

IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
M	Stoffmengenkonzentration (Molarität); hier auch mol/L
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar; mmol/L
mind.	mindestens
min	Minute
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar; μ mol/L
mRNA	messenger RNA
M-PBS-T	PBST mit Milchpulver
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekülmasse (<i>molecular weight</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
OS	Osmotischer Schock
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (<i>phosphate buffered saline Tween-20</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Periplasmatischer Extrakt
<i>pelB</i>	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pfu	<i>plaque forming unit</i>
pHAL14	Phagemid
pIT2	Phagemid
PPP	Periplasmatische Präparation
pOPE	Plasmid für optimierte Protein Expression
PR	Panningrunde
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QCM	Quarzmikrowaage (<i>quartz crystal microbalance</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	selbstorganisierender Monolayer (<i>self assembling monolayer</i>)
scFv	<i>single chain Fv</i>
scFv-Fc	<i>single chain Fragment variable Fragment crystallisable fusion</i>
SDS	Sodium Dodecylsulfat

Stabw	Standardabweichung
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetrazyklin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)aminomethan (auch Trometamol)
ÜKS	Überkopfschüttler
ü. N.	über Nacht
U	Unit
V	Volt
V _H	variable Domäne der schweren Antikörper-Kette
V _L	variable Domäne der leichten Antikörper-Kette
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

I EINLEITUNG

I.1 AUFBAU UND FUNKTION VON ANTIKÖRPERN

Antikörper, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, sind ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems von Wirbeltieren (Vertebraten ab der Überklasse der *Gnathostomata*) und spielen eine Schlüsselrolle bei der adaptiven Immunantwort dieser Organismen. Antikörper wurden erstmals gegen Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben, als sie von Emil von Behring und Shibasaburō Kitasato in Blutseren entdeckt wurden (von Behring & Kitasato, 1890). Diese Leistung wurde 1901 mit dem ersten Medizin-Nobelpreis geehrt. Im darauf folgenden Jahrhundert wurde die Bedeutung der Antikörper in der Immunologie aufgrund zahlreicher, bahnbrechender Arbeiten immer deutlicher. So erhielten Gerald M. Edelman und Rodney Robert Porter 1972 für die Aufklärung der molekularen Struktur von Antikörpern den Nobelpreis für Medizin (Edelman & Gally, 1964). Ein weiterer Meilenstein war die Entwicklung der Hybridomatechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Kohler & Milstein, 1975), wofür beide gemeinsam mit Niels Kaj Jerne 1984 ebenfalls mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet wurden.

Aufgrund dieser und vieler weiterer Arbeiten sind heute Aufbau und Funktion von Antikörpern, die von B-Lymphozyten gebildet und ins Blutplasma sezerniert werden, weitestgehend bekannt. Die variable Region (V_L und V_H), die bei jedem Antikörpermolekül unterschiedlich ist, ist für die hochspezifische Bindung des Antigens verantwortlich. Die für die Effektorfunktion zuständige Region ist weniger variabel und wird deshalb als konstante Region bezeichnet. Insgesamt werden Antikörper in fünf Klassen (Isotypen) unterteilt, die nach ihren jeweiligen schweren Ketten α , δ , ϵ , γ und μ als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet werden und teilweise unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben (Burmester *et al.*, 1998). Dazu gehören die Opsonisierung von Pathogenen, die Neutralisierung von Toxinen und die Aktivierung des Komplementsystems, einem Teil des angeborenen Immunsystems. Zusätzlich rekrutieren und aktivieren sie weitere Zellen des Immunsystems. Die konstante Region ist aus den Domänen C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} sowie C_{H4} bei IgM und IgE aufgebaut (Edelman, 1973). Die Immunglobuline IgA und IgM können dabei Dimere bzw. Pentamere ausbilden (Janeway *et al.*, 2009). Immunglobuline des Isotyps IgG, die mit 80 % den größten Teil der Immunglobuline im humanen Blutserum darstellen, haben eine relative Molekülmasse von $M_r \approx 150.000$ und sind als Heterodimer aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L) zusammengesetzt. Die schweren Ketten haben eine M_r von je 50.000 und sind über zwei Disulfidbrücken in der flexiblen Gelenk-Region miteinander

verbunden. Jede schwere Kette ist zusätzlich über eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette kovalent assoziiert (Edelman, 1973). Die leichten Ketten weisen eine relative Molekülmasse von $M_r \approx 25.000$ auf und bestehen aus einer N-terminalen, variablen Domäne (V_L) und einer C-terminalen, konstanten Domäne (C_L). Sie werden in die Klassen λ und κ eingeteilt, wobei das Verhältnis zwischen λ und κ beim Menschen bei 2:3 liegt (Abbas *et al.*, 2007). Alle vier Ketten bilden gemeinsam vereinfacht eine Y-Struktur aus (Abbildung I.1).

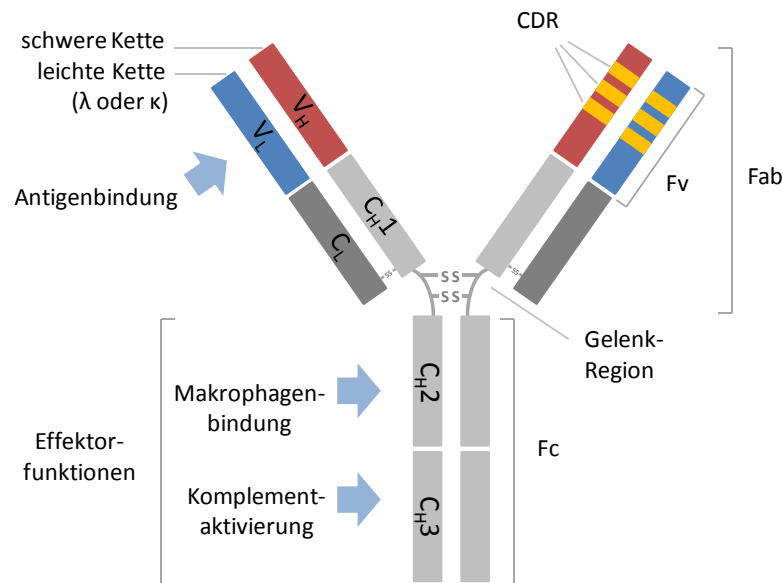


Abbildung I.1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers.

Jedes Immunglobulinmolekül besteht aus je zwei identischen schweren („H“) und leichten („L“) Ketten, die über Disulfidbrücken (S-S) miteinander verbunden sind. Die variablen Regionen der schweren (V_H , rot) und leichten (V_L , blau) Kette bilden das *fragment variable* (Fv). Gemeinsam mit den konstanten Regionen (C_L und C_{H1} , grau) wird das *fragment antigen binding* (Fab) gebildet, welches für die Antigenbindung verantwortlich ist. Dabei bilden die hypervariablen CDRs (gelb) und die flankierenden Gerüstregionen von V_H und V_L die Antigenbindungstasche. Dem gegenüber steht das *fragment crystallizable* (Fc), welches aus den konstanten Regionen der schweren Kette (C_{H2} und C_{H3} , grau) besteht und für Makrophagenbindung und Aktivierung von Effektorfunktionen zuständig ist.

In der aminoterminalen variablen Fv-Region (engl.: *fragment variable*) der schweren Kette (V_H) und leichten Kette (V_L) befinden sich jeweils drei hypervariable CDRs (engl.: *complementarity determining regions*). Sie bestehen aus je 3 – 20 Aminosäuren (AS) (Griffiths *et al.*, 1993), die für die hohe Spezifität der variablen Domänen verantwortlich sind. Die CDRs stehen als Schleifen-Strukturen hervor und bilden im nativ gefalteten Zustand des Antikörpers die Antigenbindungstasche (Paratop). Die flankierenden Gerüstregionen (engl.: *framework regions*) bilden eine zylinderförmige Struktur aus β -Faltblättern aus und stabilisieren somit die CDRs (Wu & Kabat, 1970). Gemeinsam bilden beide Regionen die Antigenbindestelle und formen dabei eine komplementäre Oberfläche zur antigenen Determinante (Epitop). Die Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt nicht kovalent und basiert auf Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräften (Voet *et al.*, 2002). Die Fv-Region

ergibt zusammen mit den beiden konstanten Bereichen C_H1 der schweren und C_L der leichten Kette das Fab-Fragment (engl.: *fragment antigen binding*). Die konstanten Regionen C_H2 und C_H3 bilden den konstanten Fc-Teil (engl.: *fragment crystallizable*), der bei den fünf Isotypen unterschiedliche Glykosylierungsmuster aufweisen kann.

I.2 REKOMBINANTE ANTIKÖRPERFRAGMENTE

In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene rekombinante Antikörperfragmente entwickelt, die vor allem in der Diagnostik und Therapie zunehmend an Bedeutung gewinnen. So konnte zunächst durch enzymatische Spaltung eines IgG-Moleküls mit der Cysteinprotease Papain an der Gelenkregion ein Fc-Fragment und je zwei Fab-Fragmente erzeugt werden (Michaelson & Natvig, 1972). Heutzutage können verschiedene Antikörperfragmente in heterologen Produktionssystemen unter genau kontrollierbaren Bedingungen synthetisiert werden (Blazek & Celer, 2003).

Neben dem kleinsten und in der Diagnostik wahrscheinlich am häufigsten genutztem Antikörperfragment, dem scFv-Fragment (engl.: *single chain fragment variable*), kamen in dieser Arbeit weitere Antikörperfragmente und Fusionsproteine zum Einsatz (Abbildung I.2). Bei dem scFv-Fragment sind die variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) mit Hilfe eines Peptidlinkers verbunden (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Die Vorteile des scFv-Fragments sind eine geringe Halbwertszeit und Immunogenität sowie eine einfache und kostengünstige Produktion in prokaryotischen Expressionssystemen wie z. B. dem Gram-negativen *Escherichia coli*. Zum Einsatz kommen scFv-Fragmente vor allem dann, wenn lediglich die Antigenbindung und keine Aktivierung des Immunsystems wie z. B. bei der *In-vivo*-Diagnostik erwünscht sind. Nachteilig dagegen ist die Tendenz zur Dimer- bzw. Aggregatbildung bei höheren Proteinkonzentrationen (Worn & Pluckthun, 2001).

Ein weiteres rekombinantes Antikörperfragment ist der scAb (engl.: *single chain antibody*; Abbildung I.2). Hierbei wird an das scFv-Fragment C-terminal die konstante Domäne der leichten Kette κ (C_κ) oder λ (C_λ) fusioniert, was zu einer Stabilisierung des Antikörperfragments führt (McGregor *et al.*, 1994). So konnte die Produktionsausbeute der scFv-Fusionen sowohl in Insektenzellen (Reavy *et al.*, 2000) als auch in zellfreiem *E.-coli-S30*-Zelllysat gesteigert werden (Palmer *et al.*, 2006). Möglicherweise wird durch $C_{\kappa/\lambda}$ die wachsende Polypeptidkette während der zellfreien Synthese stabilisiert, die Faltung verbessert oder das Fusionsprotein besser vor Degradation geschützt.

Durch die Fusion von scFv-Fragmenten mit anderen Proteinen wie z. B. dem SNAP-Tag werden viele weitere Anwendungsgebiete ermöglicht (Abbildung I.2). Bei dem SNAP-Tag handelt es sich um eine mutierte Form des humanen DNA-Reparaturproteins O6-Alkylguanin-DNA-

Alkyltransferase (hAGT) (Kufer *et al.*, 2005). Die Fusionsproteine weisen dann eine enzymatische Aktivität auf und können Substrate spezifisch und kovalent binden. Dadurch ist eine Detektion der SNAP-Tag-Fusionsproteine mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Substratmoleküle sowohl auf Zelloberflächen (Cao *et al.*, 2007) als auch innerhalb der Zelle (Gautier *et al.*, 2008) möglich. Zudem können scFv-SNAP-Fusionsproteine kontrolliert an feste Oberflächen, wie beispielsweise mit Dextran beschichtete CM5-Chips, immobilisiert werden (Kampmeier *et al.*, 2009). Vorteil dabei ist die Erhaltung der biologisch aktiven Form des Zielproteins und die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums (Kindermann *et al.*, 2003). So können unter anderem Interaktionen zwischen Proteinen auf Chipoberflächen über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (engl.: *surface plasmon resonance*, SPR) bestimmt werden (Huber *et al.*, 2004).

In der Therapie werden nach wie vor hauptsächlich vollständige IgG-Moleküle verwendet, welche zusätzliche Effektorfunktionen vermitteln können (Janeway *et al.*, 2009). Eine Alternative hierzu stellen scFv-Fc-Antikörper dar (Abbildung I.2). Durch Fusion von zwei scFv-Fragmenten an den Spezies-spezifischen Fc-Teil eines Immunglobulins über flexible Peptidlinker entsteht ein bivalentes Antikörperformat (Moutel *et al.*, 2009). ScFv-Fc-Antikörper verfügen aufgrund der Dimerisierung über eine höhere Stabilität und apparente Affinität als scFv-Fragmente. Die Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen ist für verschiedene eukaryotische Organismen, wie z. B. Säugerzellen (Kato *et al.*, 1995) und Hefen (Powers *et al.*, 2001), beschrieben.

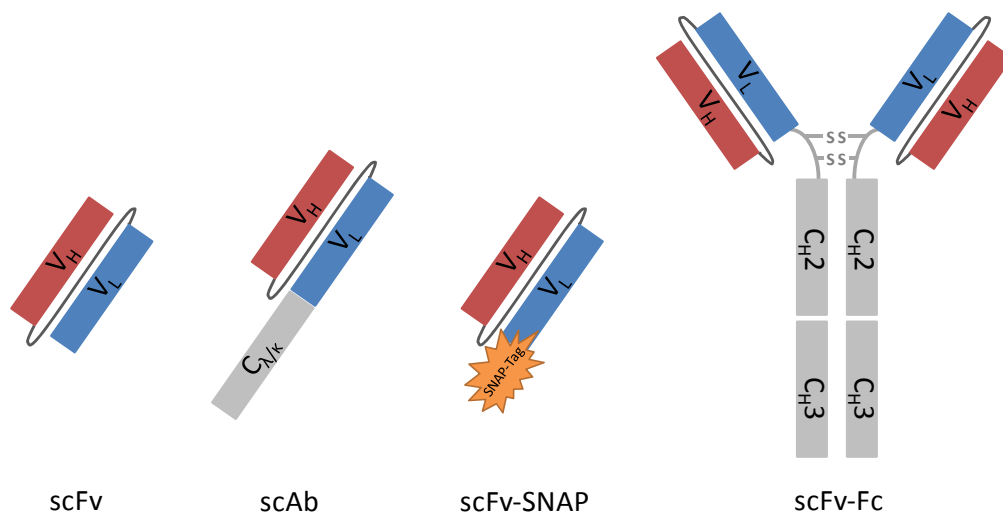


Abbildung I.2: Schematischer Aufbau verschiedener Antikörperformate.

Dargestellt sind ein scFv-Fragment, bei dem die beiden variablen Regionen V_H und V_L der schweren und leichten Kette mit einem variablen Linker verbunden vorliegen, ein scAb, der durch Fusion der konstanten Domäne der leichten Kette λ bzw. κ an ein scFv-Fragment entsteht, eine scFv-SNAP-Fusion und ein scFv-Fc-Antikörper, bei der zwei scFv-Fragmente direkt über die Gelenk-Region an den Fc-Teil eines IgG gekoppelt sind.

I.3 ANTIKÖRPER-PHAGEN-DISPLAY-TECHNOLOGIE

Im Gegensatz zu den beiden klassischen Methoden zur *In-vivo*-Generierung von Antikörpern, der Immunisierung von Versuchstieren (von Behring & Kitasato, 1890) und der Hybridoma-Technologie (Kohler & Milstein, 1975), werden bei der Antikörper-Phagen-Display-Technologie rekombinante Antikörper *in vitro* hergestellt (Smith, 1985). Dabei werden auf der Oberfläche von Bakteriophagen Antikörperfragmente präsentiert und deren genetische Information in das Phagen genom integriert. Durch diese Kopplung von Geno- und Phänotyp und die anschließende klonale Selektion von Bindern werden zwei essentielle Funktionsprinzipien der B-Lymphozyten des Immunsystems nachgeahmt. Somit wird eine Selektion und Amplifikation spezifischer Antikörperfragmente aus einem sehr großen Repertoire ermöglicht (Breitling *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991).

I.3.1 Bakteriophage M13

Bakteriophagen (kurz Phagen), die erstmals 1917 beschrieben wurden (D'Herelle, 1917), sind Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren. Der in dieser Arbeit verwendete filamentöse Bakteriophage M13 (Abbildung I.3) gehört zur Familie der *Inoviridae* (Klasse Ff), deren Virusgenom aus zirkulärer, einzelsträngiger DNA besteht (Ray *et al.*, 1966). Nach der Infektion der Bakterien werden pro Zellzyklus ca. 200 Phagenpartikel freigesetzt, wobei die Wirtszellen dadurch nicht getötet sondern lediglich in ihrem Wachstum um bis zu 50 % gehemmt werden (Webster, 2001). Der Bakteriophage M13 ist ca. 800 – 2000 nm lang, besitzt einen Durchmesser von ungefähr 6 nm (Marvin, 1998) und ist gegenüber Trypsinverdau und erhöhten Temperaturen resistent (Breitling & Dübel, 1997).

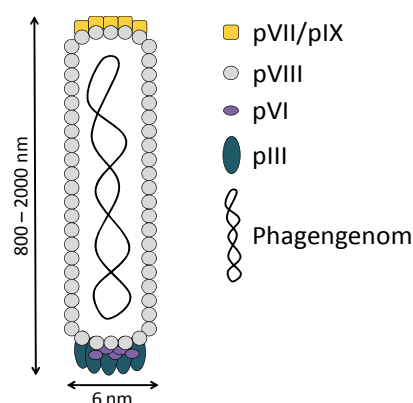


Abbildung I.3: Schematische Darstellung des M13-Bakteriophagen.

Der Hauptbestandteil der Hülle des filamentösen Phagens bildet das Protein pVIII. Die anderen Proteine liegen in drei- bis fünffacher Kopie vor. Das Phagen genom besteht aus zirkulärer, einzelsträngiger DNA. Es hat eine Größe von etwa 6,5 kb und kodiert für 11 Gene.

Das Phagengenom besitzt eine Größe von etwa 6,5 kb und kodiert für insgesamt 11 Gene. Je drei dieser Gene werden für die Replikation der DNA und den Zusammenbau der Phagenpartikel benötigt, die anderen fünf Gene kodieren für die Hüllproteine. Das Protein pVIII macht mit seinen ≈ 2700 Kopien den Hauptbestandteil der Virushülle aus und bildet deren tubuläre Struktur aus. Das Protein pIII liegt am Kopfende in drei- bis fünffacher Kopie vor und ist für die Bindung des Phagenpartikels an die Wirtszelle verantwortlich (Webster, 2001). Da die Infektion der Wirtszellen über F-Pili erfolgt, werden ausschließlich Zellen infiziert, die ein F'-Plasmid oder ein F'-Episom tragen (Smith, 1985).

I.3.2 Phagen-Display

Mit Hilfe des Phagen-Displays können Antikörper gegen fast jedes Antigen selektiert werden. Dabei werden Peptide oder Proteine auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert (Smith, 1985; Willats, 2002). Hierfür wird das Oberflächenprotein pIII mit einem heterologen Peptid oder Protein fusioniert und ohne Funktionsverlust in die Phagenhülle integriert (Barbas *et al.*, 1991). Dabei kann das für das Fusionsprotein kodierende Gen entweder in das Phagengenom integriert (McCafferty *et al.*, 1990) oder auf einem Phagemid (auch Phagen-Display-Vektor genannt) liegend eingefügt werden (Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991). Phagemide enthalten neben den für die Replikation und Selektion in *E. coli* notwendigen Elementen auch ein Signalpeptid für die Sekretion des Antikörperfragments in das Periplasma von *E. coli*, um die korrekte Faltung des Antikörperfragments im nicht-reduzierenden Milieu zu gewährleisten (Skerra & Pluckthun, 1988). Zusätzlich ist ein Verpackungssignal für den korrespondierenden filamentösen Phagen vorhanden (Abbildung I.4). Da auf dem Phagemid außer dem für das Oberflächenprotein pIII kodierenden Gen *gIII* keine weiteren Phagenproteine kodiert vorliegen, ist die Anwesenheit eines Helferphagens notwendig. Diese stellt die Komponenten für die Phagenreplikation bereit, so dass das Phagemid während der Assemblierung der Phagenpartikel in diese verpackt und das Antikörperfragment-pIII-Fusionsprotein in die Phagenhülle eingebaut werden kann. Da das Wildtyp-pIII des Helferphagens bevorzugt in die Partikel eingebaut wird, resultiert dies zu einer statistisch monovalenten Präsentation des Antikörperfragments auf der Phagenoberfläche (Chasteen *et al.*, 2006). Für ein polyvalentes Display können modifizierte Helferphagen (z. B. Hyperphage), die z. B. ein zum Teil deletiertes *gIII* (kodiert für pIII) enthalten, verwendet werden (Rondot *et al.*, 2001; Soltes *et al.*, 2007). Die Expression des Fusionsgens ist im Phagemid-System durch einen induzierbaren Promotor (P_{lacZ}) steuerbar (Breitling & Dübel, 1997).

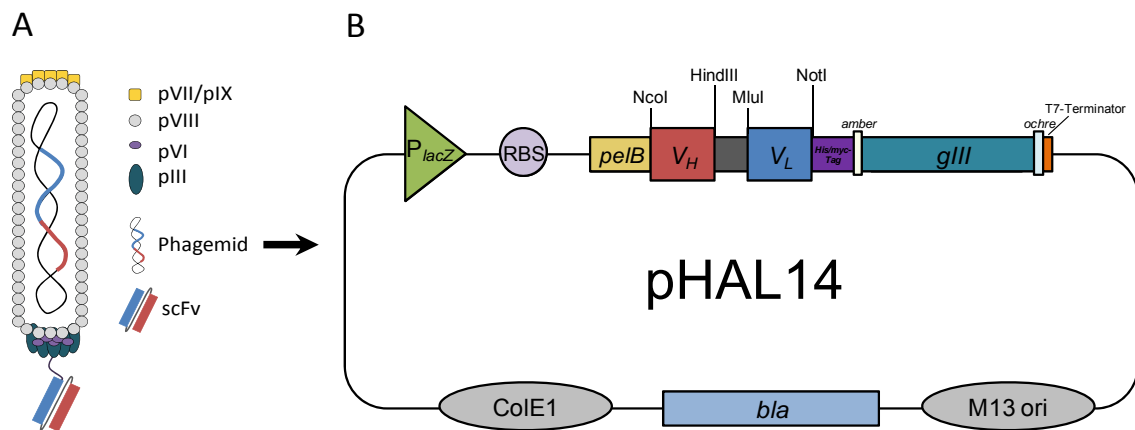


Abbildung I.4: Schematische Darstellung eines M13-Antikörper-Phagens und des Phagemids pHAL14. (A) Für das Phagen-Display von scFv-Fragmenten liegen diese als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII vor und werden auf der Oberfläche des M13-Phagens präsentiert. Das für das scFv-pIII-Fusionsprotein kodierende Gen ist auf dem Phagemid kodiert. (B) P_{lacZ}: induzierbarer lacZ-Promotor; RBS: Ribosomen-Bindungsstelle; pelB: Gen des Signalpeptids; V_H: Gen der schweren Kette des scFv; V_L: Gen der leichten Kette des scFv; His- und Myc-Tag für Reinigung und Detektion des scFv-Fragments; amber: Stopp-Codon UAG; ochre: Stopp-Codon UAA; gIII: Gen des Phagen-Hüllproteins pIII; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*; M13 ori: Phagen-Verpackungssignal; bla: β -Lactamase-Gen (Selektionsmarker).

I.3.3 Antikörpergenbibliotheken

Antikörpergenbibliotheken mit einer theoretischen Komplexität von $10^7 - 10^{10}$ verschiedenen Einzelklonen können aus humanen Lymphozyten isoliert, in Phagen verpackt und auf ihrer Oberfläche präsentiert werden (Breitling & Dübel, 1997).

Dabei unterscheidet man zwischen Immunbibliotheken und universellen Bibliotheken. Erstgenannte werden mit Hilfe immunisierter Spenderorganismen hergestellt. Im Spender sind bereits primäre und sekundäre Immunantworten gegen das verwendete Antigen erfolgt, wodurch affinitätsgereifte IgG-Antikörper vorliegen. Durch Amplifizierung der V-Gene von IgG sekretierenden B-Lymphozyten wird eine Antikörpergen-Diversität von $10^6 - 10^7$ erreicht (Burton *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991). Immunbibliotheken erlauben die Generierung hochaffiner Antikörperfragmente. Jedoch ist eine Anreicherung von Bindern gegen Antigene, die nicht für die Immunisierung verwendet wurden, stark eingeschränkt.

Im Gegensatz dazu wird bei universellen Bibliotheken das IgM-Genrepertoire aus B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender amplifiziert, wodurch Antikörpergen-Diversitäten von $10^8 - 10^{10}$ erreicht werden (de Haard *et al.*, 1999; Hust *et al.*, 2007a). Aufgrund der großen Komplexität und der Beteiligung von IgM an der primären Immunantwort können aus universellen Bibliotheken Antikörper gegen nahezu jedes beliebige Antigen isoliert werden (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993). Universelle Bibliotheken werden in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken eingeteilt. Naive Bibliotheken enthalten die Gene der Antikörperfragmente aus den Spendern in unveränderter Form. Lediglich die Kombination

aus V_H und V_L ist zufällig. Im Gegensatz dazu sind bei semi-synthetischen Bibliotheken nur einzelne AS in den CDR3-Bereichen randomisiert (Hoogenboom & Winter, 1992; Pini *et al.*, 1998; Goletz *et al.*, 2002). Bei synthetischen Bibliotheken werden vollständig randomisierte CDR-Bereiche mit definierten Framework-Regionen kombiniert, wodurch sehr hohe Komplexitäten von $10^{10} - 10^{11}$ erreicht werden (Hayashi *et al.*, 1994; Knappik *et al.*, 2000).

I.3.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning)

Die Phagen-Display-Technologie stellt ein sehr effizientes *In-vitro*-Selektionssystem zum Screening von komplexen Antikörperphagen-Bibliotheken dar. Aufgrund der hohen Sensitivität des Selektionssystems kann aus einem Gemisch mit bis zu 10^{10} verschiedenen Partikeln sogar ein einziger antigenspezifischer Antikörperphage isoliert und angereichert werden (Parmley & Smith, 1988). Hierfür wird die Antikörperphagen-Bibliothek auf dem Zielantigen inkubiert. Das Antigen kann dabei entweder an Polystyrol-Mikrotiterplatten (MTP) (Barbas *et al.*, 1991), magnetischen *Beads* (Hawkins *et al.*, 1992) und Immunoröhrchen (Hust *et al.*, 2002) immobilisiert vorliegen oder sich während der Inkubation frei in Lösung befinden und anschließend mittels *Pulldown* abgetrennt werden (Schütte *et al.*, 2009). Durch Inkubation mit z. B. BSA oder Milchpulver kann eine unspezifische Bindung der Antikörperphagen an freie Oberflächen verhindert werden. Zusätzlich können weitere Parameter wie Kompetition oder Präadsorption eingestellt werden. Nach Entfernen nicht oder schwach bindender Antikörperphagen werden spezifisch bindende Phagen eluiert (Abbildung I.5). Dies kann sowohl enzymatisch mit Trypsin, durch Verschiebung des pH-Wertes oder durch eine Erhöhung der Salzkonzentration erfolgen. Die eluierten Antikörperphagen werden zur Infektion von *E.-coli*-Zellen (F') verwendet. Durch Koinfektion mit einem Helferphagen (M13K07) können die Antikörperphagen amplifiziert und anschließend für weitere Selektionsrunden eingesetzt werden. Die 2–3malige Wiederholung der „Panning-Runde“ ermöglicht die Selektion und Anreicherung spezifisch bindender Antikörperphagen. Die Identifizierung von Einzelklonen erfolgt nach Produktion löslicher Antikörperfragmente mittels ELISA. Mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie kann so eine große Anzahl an monoklonalen Bindern detektiert und isoliert werden.

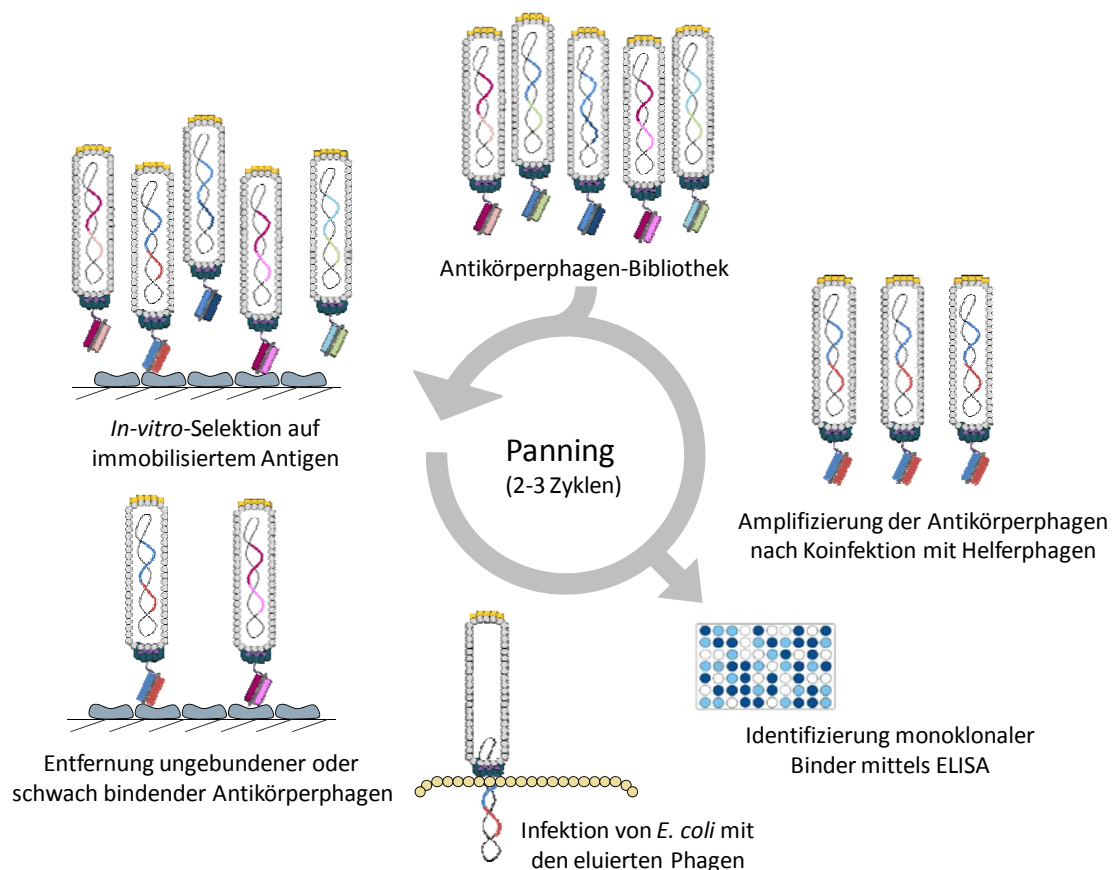


Abbildung I.5: Schematische Darstellung der Antikörperphagen-Selektion (Panning).

In einem ersten Schritt wird die Antikörperphagen-Bibliothek auf dem immobilisierten Zielantigen inkubiert. Danach werden nicht und schwach bindende Antikörperphagen durch Waschen entfernt und die gebundenen z. B. enzymatisch mit Trypsin eluiert. Die durch Koinfektion von *E. coli* mit einem Helferphagen amplifizierten Antikörperphagen können für weitere Selektionsrunden eingesetzt werden. Durch 2 – 3malige Wiederholung der „Panning-Runde“ können spezifisch bindende Antikörperphagen angereichert und isoliert werden. Die Identifizierung monoklonaler Binder gegen das Zielantigen erfolgt nach der Produktion löslicher Antikörperfragmente mittels ELISA.

I.4 VERÄNDERUNG DER BIOCHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ANTIKÖRPERFRAGMENTEN

Für bestimmte Anwendungen kann es von Bedeutung sein, dass Antikörperfragmente zusätzlich zur Antigen-spezifischen Bindung weitere maßgeschneiderte Eigenschaften aufweisen. Dazu können eine verbesserte Stabilität des Antikörperfragments gegenüber physikochemischen Einflüssen wie Temperatur, extremen pH-Werten und Salzkonzentrationen oder eine Erhöhung der Affinität und Produzierbarkeit sowie eine Verringerung der Aggregatbildung zählen.

Hierfür werden zunächst die für die Antikörperfragmente kodierenden Gene verändert, um die Antigenbindungseigenschaften des Antikörperfragments zu variieren. In einem weiteren Schritt werden dann die modifizierten Antikörperfragmente mit den gewünschten Bindungseigenschaften (z. B. Affinitätssteigerung) selektiert (Roskos *et al.*, 2007).

Mittels *Chain-shuffling* erfolgt z. B. die Erzeugung genetischer Varianten eines Antikörperfragments durch Austausch des für einer der beiden Antikörperfragmentketten kodierenden Gens durch eine Antikörpergenbibliothek der gleichen Kettenklasse (Marks *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2000).

Ist anstelle der Neuordnung einzelner Ketten die Erzeugung von Zufallsmutationen im gesamten Phagemid erwünscht, bietet die Verwendung von *E.-coli*-Mutatorstämmen eine weitere Möglichkeit (Low *et al.*, 1996; Irving *et al.*, 1996; Coia *et al.*, 2001; Nguyen & Daugherty, 2003). Da die generierten Mutationen ungerichtet sind und sowohl das Phagemid als auch das Wirtsgenom betreffen können, ist eine stringente Selektion zur Vermeidung unerwünschter Mutationen in essentiellen Genabschnitten unbedingt erforderlich. Von Vorteil ist dabei der Einsatz spezieller Mutatorstämmen (z. B. *E. coli mutD5* FIT). Diese ermöglichen eine direkte Produktion der Antikörperphagen, da keine Transformation mit den Phagemiden erforderlich ist. So können Mutationsrate von 0,3 Punktmutationen pro 1000 bp und Amplifikationszyklus erreicht werden (Coia *et al.*, 2001). Weitere Methoden zur Erzeugung von Mutationen im gesamten Wirtsgenom und dem Phagemid sind der Einsatz von ionisierender β -Strahlung und die chemische Mutagenese.

Im Gegensatz dazu erlaubt die *Error-prone*-PCR unter Einsatz spezifischer Primersets das Einbringen zufälliger Mutationen ausschließlich in das Antikörperfragmentgen. Hierbei kann die Fehleranfälligkeit der DNA-Polymerase durch Variation der PCR-Pufferbedingungen (Johnson & Hawkins, 1996; Daugherty *et al.*, 2000; Martineau, 2002; Cirino *et al.*, 2003), z. B. durch $MnCl_2$ -Zugabe (Fromant *et al.*, 1995) oder der Verwendung von Nukleotid-Analoga (Zaccolo & Gherardi, 1999), künstlich erhöht werden. Die gleichen Effekte können durch die Verwendung spezieller Mutationspolymerasen (z. B. *Mutazyme II* DNA-Polymerase), die *per se* über eine höhere Mutationsrate verfügen, erzielt werden. Durch mehrere, aufeinanderfolgende *Error-prone*-PCR-Runden können Mutationsraten von bis zu 50 Punktmutationen pro 1000 bp erzielt werden (Graff *et al.*, 2004). Durch *DNA-Shuffling* kann die Mutationsverteilung nochmals erhöht werden (Stemmer, 1994a, b; Fermer *et al.*, 2004).

Sollen die Mutationen nur die einzelnen CDR-Bereiche betreffen, kann die Randomisierung mit Hilfe degenerierter Oligonukleotid-Primer erfolgen (Schier & Marks, 1996; Chowdhury & Pastan, 1999). Bei der sogenannten Hotspot-Randomisierung werden anhand von *In-silico*-Analysen der Antikörperfragmentgene Hotspot-Codons ermittelt, die einer verstärkten natürlichen Mutation unterliegen. Diese Codons können dann mit Hilfe PCR-basierter Methoden gezielt mutiert werden (Yau *et al.*, 2005). Nachteil aller PCR-Methoden ist die Notwendigkeit der Klonierung der PCR-Produkte, wodurch die Komplexität der erzeugten Bibliotheken durch den Transformationsschritt begrenzt wird.

Wurde eine ausreichende Variation der Ausgangsantikörpergene erreicht, wird die mutierte Antikörpergenbibliothek mit Hilfe eines Helferphagen verpackt. Durch geeignete Selektionsmethoden können nun Antikörperphagen mit den gewünschten Eigenschaften selektiert werden. Dabei können die Rahmenbedingung (Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration) während des Selektionsprozesses (Panning) gemäß den Anforderungen an die Antikörperfragmente eingestellt werden. Ferner kann die Konkurrenz der Antikörperphagen um die Bindung an das Antigen zur Anreicherung von Varianten mit höherer Affinität zum Antigen oder besserer Produzierbarkeit führen. Dieser Effekt kann durch die Immobilisierung geringer Mengen (<10 ng) des Antigens an eine feste Phase (z. B. Polystyrol) und anschließende Inkubation der Antikörperphagen-Bibliothek verstärkt werden. Durch sehr stringente Waschbedingungen (z. B. große Puffervolumina) wird eine Anreicherung affinitätsgereifter Antikörperfragmente erreicht (Thie *et al.*, 2009; Thie *et al.*, 2011). Eine Möglichkeit zur Selektion von Bindern mit hohen Assoziationskonstanten könnte durch extrem kurze Inkubationszeiten auf dem Antigen realisiert werden.

I.5 C-REAKTIVES PROTEIN (CRP)

Das C-reaktive Protein (CRP) wurde erstmals 1930 im Krankenhaus des *Rockefeller Institute for Medical Research* im Serum von Patienten mit einer pneumokokkalen Lungenentzündung entdeckt. Dabei wurde CRP als eine Substanz beschrieben, die mit C-Polysacchariden von *Pneumococcus pneumoniae* reagiert und zusammen mit Kalziumionen ein Präzipitat bildet. Später konnte CRP als die für diese Präzipitation im Serum verantwortliche Substanz identifiziert werden (McCarty, 1982).

Das Gen für humanes CRP ist auf dem 1q23.2-Chromosom lokalisiert, enthält ein Intron und kodiert für insgesamt 224 AS (Lei *et al.*, 1985). Die mit einem Signalpeptid (AS 1 – 18) beginnende, reife Polypeptidkette weist eine relative Molekülmasse M_r von 23.000 auf (Black *et al.*, 2004). CRP kann in zwei unterschiedliche, sich aber überlappende Proteingruppen eingeteilt werden. Aufgrund seiner biologischen Funktion wird es zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt. Auf Basis seiner Struktur und der Kalziumionen-abhängigen Bindungseigenschaften kann es in die Familie der Pentraxine eingeordnet werden (Kilpatrick & Volanakis, 1991; Du Clos & Mold, 2004). Es ist ein phylogenetisch hoch konserviertes Plasmaprotein mit Homologen bei Vertebraten und Invertebraten. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) entsteht biologisch aktives CRP aus fünf identischen, miteinander nicht-kovalent verknüpften Monomeren (Protomere), die zyklisch um eine Pore angeordnet werden (Abbildung I.6).

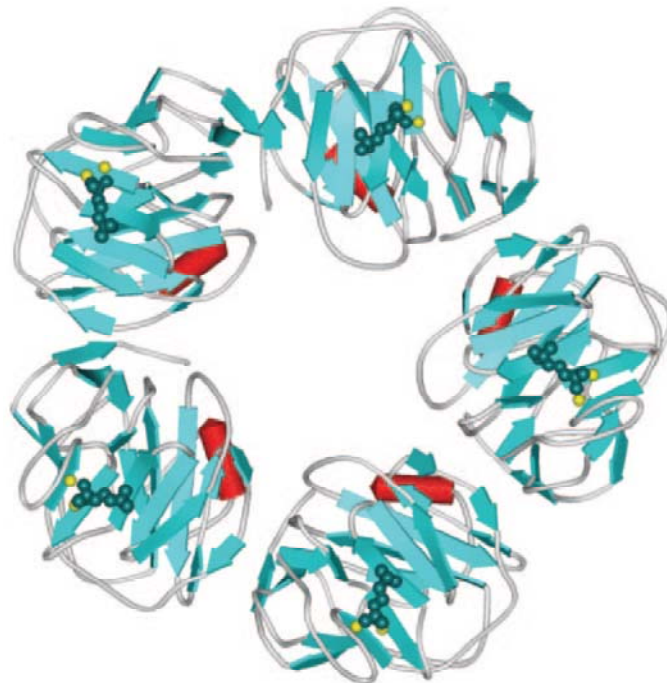


Abbildung I.6: Kristallstruktur von humanem C-reaktivem Protein in Interaktion mit Phosphocholin. Dargestellt ist die Quartärstruktur eines CRP-Pentamers (grau) mit den Struktur gebenden Elementen: β -Faltblätter (hellblau) und α -Helices (rot). Jedes der fünf Protomere kann Phosphocholin (grün) in Interaktion mit zwei Kalzium-Ionen (gelb) binden (Black *et al.*, 2004).

Eine Seite des Pentamers dient, unterstützt von zwei Kalzium-Ionen pro Protomer, der Ligandenbindung, während die zweite für die Bindung anderer Proteine und Rezeptoren verantwortlich ist. Der Ligand mit der höchsten Affinität zu CRP ist Phosphocholin, welches ein Bestandteil der Zellwand von Bakterien und Pilzen darstellt (Volanakis, 2001) und außerdem am Zellwandaufbau humaner Plasmalipoproteine beteiligt ist (Thompson *et al.*, 1999). Eine Konformationsänderung im allosterischen CRP-Makromolekül führt nach Bindung des ersten Liganden zu einer erhöhten Affinität zu den konsekutiven Liganden. CRP kann außerdem an Histone und Chromatin (Du Clos *et al.*, 1988), kleine nukleare Ribonukleoproteine (snRNPs; Du Clos, 1989), Phosphoethanolamin, Fibronectin, Laminin und Polykationen (Agrawal *et al.*, 2001; Black *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2004) sowie Teile des Komplementsystems binden (Volanakis, 1982).

Die Aktivierung des Komplements erfolgt über den klassischen Weg durch Komplexbildung von Phosphocholin und Bindung des Komplementfaktors C1q (Kaplan & Volanakis, 1974). Dies führt als Teil der angeborenen Immunabwehr zur Opsonisierung und Phagozytose Phosphocholin enthaltender Mikroorganismen (Wolbink *et al.*, 1996; Agrawal *et al.*, 2001). Außerdem wird durch Komplexbildung von CRP mit dem Komplement kontrollierenden Faktor H die nachfolgende Entzündungsreaktion reguliert (Mold *et al.*, 1984; Mold *et al.*, 1999). Diese Regulation spiegelt sich auch in Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) wider, bei dem ein zu niedriger CRP-Spiegel die Bildung von Autoantikörpern begünstigt (Du Clos & Mold, 2004). Der präventive Schutz vor Autoimmunerkrankungen liegt vermutlich unter anderem in der Erkennung von normalerweise maskiertem, aber in nekrotischen oder apoptotischen Zellen exponiertem Phosphocholin der Zellmembran. CRP bewirkt einen schnellen Abbau des beschädigten Gewebes durch Aktivierung von Makrophagen und beugt damit weiteren Entzündungsreaktionen sowie der Bildung von Autoantikörpern vor (McCarty, 1982; Gershov *et al.*, 2000; Du Clos & Mold, 2004). Die Bindung von CRP an die Fc-Rezeptoren von IgG-Molekülen (FcγRI und FcγRIIa) führt ebenfalls zur Opsonophagozytose von Mikroorganismen und apoptotischen Körperzellen (Gewurz *et al.*, 1995), hat aber auch anti-inflammatorische Effekte zur Folge. Dazu gehören die Ausschüttung von Interleukin 10 (IL-10), die Induktion der Expression von IL-1-Rezeptoren und die Hemmung der Interferon-γ-Synthese (Tilg *et al.*, 1993; Mold *et al.*, 2002; Szalai *et al.*, 2002). Demgegenüber stehen pro-inflammatorische Effekte wie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (z. B. Plasminogenaktivator Inhibitor (PAI) 1), wie die Stimulation von IL-8 oder wie der Anstieg von IL-1, IL-6, IL-18 und TNF-α (Ballou & Lozanski, 1992; Galve-de Rochemonteix *et al.*, 1993; Marnell *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 2000; Venugopal *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2004). Die Aktivierung durch CRP führt bei Makrophagen neben der

Phagozytose zu weiteren Effekten. So wurden eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme und ein höherer Sauerstoffverbrauch von Phagozyten (Zeller *et al.*, 1986), die Produktion von Wasserstoffperoxid durch Phagozyten (Tebo & Mortensen, 1991) als auch die Aktivierung tumorizider Aktivitäten nachgewiesen (Barna *et al.*, 1987; Tebo & Mortensen, 1991). Im Gegensatz dazu scheint CRP die Aktivierung von Neutrophilen herunter zu regulieren (Dobrinich & Spagnuolo, 1991).

Die CRP-Produktion findet hauptsächlich in Hepatozyten statt (Hurlimann *et al.*, 1966). Es wurde jedoch auch eine extrahepatische Produktion gezeigt (Dong & Wright, 1996). So konnte nachgewiesen werden, dass CRP in sehr geringen Mengen lokal von Neuronen, Monozyten, Lymphozyten und in artherosklerotischen Plaques gebildet wird (Kuta & Baum, 1986; Jialal *et al.*, 2004). CRP akkumuliert dabei in zytoplasmatischen Vakuolen sowie in den Membranen und Lumina des Golgi-Apparates (Kushner & Feldmann, 1978) und des rauen und glatten ERs, in dem es, ohne einen inflammatorischen Stimulus, über zwei Carboxylesterasen gebunden ist (Macintyre *et al.*, 1994). Nach Induktion der vermehrten CRP-Produktion durch IL-6 nimmt die Bindungsaffinität der Carboxylesterasen ab und CRP wird in den Blutkreislauf abgegeben (Yue & Muller-Greven, 1996).

Bei gesunden Menschen liegt der Medianwert der CRP-Konzentration im Serum bei unter 0,8 mg/L, bei 10 % der Bevölkerung hingegen bei über 3,0 mg/L und bei 1 % über 10 mg/L (Shine *et al.*, 1981). Dabei werden Konzentrationen von über 10 mg/L in Verbindung mit starken Entzündungsreaktionen wie Infektionen oder Traumata gebracht (Jialal *et al.*, 2004). Bei einer Akute-Phase-Stimulation, z. B. in Folge einer bakteriellen Infektion, kann die CRP-Konzentration innerhalb weniger Stunden auf ein 100 – 1.000faches des Normalwerts ansteigen (Husebekk & Hansson, 2000; Kushner, 2001). In seltenen Fällen konnte sogar ein Anstieg um den Faktor 10.000 von weniger als 50 µg/L auf über 500 mg/L gezeigt werden (Pepys & Hirschfield, 2003). Die Halbwertszeit von CRP beträgt bei Bindung an einen Liganden ungefähr 19 h (Vigushin *et al.*, 1993).

Das breite Wirkungsspektrum, der frühe Anstieg im Infektionsverlauf und seine deutliche Konzentrationsschwankung machen CRP – noch vor der Körpertemperatur und der Anzahl der weißen Blutkörperchen – zu dem wichtigsten Indikator bei Sepsis (Povoa *et al.*, 1998) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Koenig *et al.*, 1999). Da CRP spezifisch für eine bakterielle Erkrankung ist, wird außerdem eine Unterscheidung von viralen und bakteriellen Infektionen möglich (Schofield *et al.*, 1982; Tejani *et al.*, 1995).

Die Bestimmung von CRP erfolgt entweder mit Hilfe optischer Messmethoden wie Immunonephelometrie und Immunoturbidimetrie durch Agglutination von mit Antikörperbeschichteten Latex-*Beads* oder mittels Immunoassays (Clyne & Olshaker, 1999).

Allerdings setzen die genannten Methoden eine Grundausstattung an Laborgeräten voraus und führen durch Aufarbeitung, Transport und Messung der Proben zu Zeitverzögerungen, die im Falle einer Sepsis oder einer Herzkreislauferkrankung einen entscheidenden Faktor darstellen können (Yager *et al.*, 2006). Daher ist ein einfach anwendbarer, handlicher Schnelltest für die Bestimmung von CRP von sehr großem Interesse (Black *et al.*, 2004).

I.6 LAB-ON-A-CHIP

Als *Lab-on-a-Chip* werden diagnostische Systeme bezeichnet, welche die gesamte Funktionalität eines normalen Labors auf einer wenigen Quadratzentimeter großen Oberfläche ausüben können. Innerhalb dieser, meist mikrofluidischen Systeme können komplexe biologische, chemische oder physikalische Prozesse durchgeführt werden. Dabei sorgen die mikrofluidalen Kanäle für den Transport, die Auftrennung und Analyse mit Hilfe verschiedener Sensoren (Abgrall & Gué, 2007). Verwendung finden solche Systeme bereits bei verschiedenen biochemischen Assays, bei Antikörper basierenden Immunoassays, bei Amplifizierung von Nukleinsäuren mittels *Real-Time-PCR*, sowie bei Blutanalysen und Dielektrophorese für die Sortierung und Detektion von Nanopartikeln, Viren oder Zellen (El-Ali *et al.*, 2006; Yager *et al.*, 2006). *Lab-on-a-Chip*-Systeme sind kostengünstig herzustellen, leicht anzuwenden und liefern schnell die Ergebnisse, ohne dabei an Sensitivität oder Spezifität zu verlieren. Ihre kompakte Bauweise, wodurch auch mehrere unter Umständen verschiedene Tests parallel durchgeführt werden können, erlaubt zum einen eine deutliche Verringerung der benötigten Probenvolumina. Zum anderen wird dadurch ein flexibler Einsatz direkt vor Ort – eine sogenannte *Ponit-of-care*-Diagnostik – ermöglicht, von der nicht zuletzt der Patient profitiert. In den letzten Jahren ist die Nachfrage nach *Lab-on-a-Chip*-Systemen deutlich gestiegen. Gerade in Entwicklungsländern, in denen es erhebliche Schwierigkeiten bei der Etablierung verschiedener diagnostischer Technologien zu bewältigen gilt, ist ein vermehrter Einsatz denkbar. So mangelt es in diesen Ländern häufig an den für die Diagnostik notwendigen Chemikalien, Laboren, Infrastrukturen für den Probentransport oder beispielsweise stabiler Elektrizitätsversorgung und vor allem geschultem Laborpersonal (Yager *et al.*, 2006).

Bisher wurden zahlreiche miniaturisierte Bauteile wie z. B. Sensoren, Ventile, Mischeinheiten, Separationseinheiten und Pumpen konstruiert (Haeberle & Zengerle, 2007). Für die Herstellung der meisten *Lab-on-a-Chip*-Systeme wird neben Glas und Plastik vor allem Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet. Dieses zeichnet sich durch in der Herstellung geringe Kosten, sehr gute Handhabbarkeit und vor allem seine ausgezeichnete Biokompatibilität aus. Das Material ist zudem gasdurchlässig und transparent für Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich (Nguyen, 2004). Die Behandlung mit Sauerstoffplasma ermöglicht eine

Verbindung mit anderen Materialien wie Glas, Quarz oder weiteren PDMS-Strukturen. Die Herstellung mikrofluidischer Systeme erfolgt meist softlithographisch (Xia & Whitesides, 1998), wobei nur einmal eine Negativform mittels eines UV-sensitiven Fotolacks hergestellt werden muss. Die daraus resultierende Positivform aus PDMS kann nahezu beliebig oft abgeformt werden.

Für den Einsatz als Messsensor in einem mikrofluidischen System ist eine massensensitive Quarzkristallmikrowaage (engl.: *quartz crystal microbalance*, QCM) besonders geeignet. Die mittels angelegter Spannung in Schwingung versetzte Siliziumquarze wurden erstmals zu Beginn des letzten Jahrhunderts untersucht und zunächst als Verstärker und Sender verwendet (Neubig & Briese, 1997). Heutzutage werden Quarzoszillatoren in zahlreichen Bereichen eingesetzt (Janshoff *et al.*, 2000; Kurosawa *et al.*, 2003a; Liekefett *et al.*, 2003; Michalzik *et al.*, 2005b). Das Messprinzip einer QCM beruht dabei auf der konstanten Schwingung der Quarzkristalle bei einer bestimmten Eigenfrequenz von bspw. 20 MHz. Dies wird durch eine Ätzung der Quarzkristalle auf eine bestimmte Dicke erreicht. Da sich die Resonanzfrequenz proportional zur Dicke des Quarzes verändert, führen Massenveränderungen auf der Quarzoberfläche zu einer messbaren Frequenzänderung (Liekefett *et al.*, 2003). Werden nun auf diese Oberfläche spezifische Fängermoleküle wie z. B. Antikörper immobilisiert, kann eine selektive Detektion einzelner Analyte aus einer Lösung erfolgen.

Ein mögliches Einsatzgebiet für ein solches QCM-basiertes *Lab-on-a-chip*-System ist die Detektion von CRP, einem der wichtigsten Entzündungsparameter von bakteriellen Infektionen und Herz-Kreislauf-Störungen. So ist eine schnelle Reaktion auf erhöhte Messwerte z. B. bei postoperativen Kontrollen, auch außerhalb von Kliniken und Laboratorien, von großer Bedeutung (Esposito *et al.*, 2005). Bisher wird CRP durch qualifiziertes Personal unter hohem Zeitaufwand in speziellen Laboratorien in Einzeltests z. B. mittels ELISA bestimmt (Correia *et al.*, 2003; Dominici *et al.*, 2004). Daher würde sich gerade für CRP eine schnelle und kostengünstige *Point-of-care*-Diagnostik mittels eines mikrofluidischen *Lab-on-a-chip*-Systems anbieten.

I.7 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung eines, im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 578 „Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse: Vom Gen zum Produkt“ etablierten, regenerierbaren, mikrofluidischen *Lab-on-a-Chip*-Systems zur spezifischen Diagnostik von CRP. Hierfür soll eine Anreicherungszone in das Gesamtsystem integriert, die Anzahl der möglichen Messzyklen gesteigert und die CRP-Sensitivität erhöht werden. Es sollen zum einen bereits vorhandene CRP-spezifische Antikörperfragmente (Al-Halabi, 2008) zur Erhöhung der Affinität und Stabilität (pH, Temperatur) in andere Antikörperformate überführt und mutagenisiert werden. Zudem sollen mittels Phagen-Display-Technologie weitere Antikörper isoliert werden, die *per se* andere Eigenschaften aufweisen. Die veränderten Antikörper-Varianten und -Formate sowie neu identifizierte Antikörperfragmente sollen anschließend hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (Affinität, Stabilität) charakterisiert und für den Einsatz in einem QCM-basierten *Lab-on-a-Chip*-System untersucht werden. Darüber hinaus soll eine Optimierung der Antikörperkopplung an die Quarzkristallmikrowaage erfolgen. Der QCM-basierte Sensor soll abschließend durch Messungen mit Antigen-Lösungen validiert und weiter charakterisiert werden.

II MATERIAL

II.1 GERÄTE UND TECHNISCHE ANLAGEN

Die bei der Durchführung dieser Arbeit verwendeten Geräte und technische Anlagen sind in Tabelle II.1 aufgeführt.

Tabelle II.1: Geräte und technische Anlagen unter Angabe des Models und Herstellers.

Geräte	Model	Hersteller
3-Wege-Ventile	LHDA 0531115H	LEE Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH, Sulzbach
Bioreaktor	LEX TM	Harbinger Biotechnology and Engineering Corporation, Toronto (Kanada)
Blot-Apparatur	Trans Blot SD	BioRad, München
Chromatographieanlage	Äkta-Prime	GE Healthcare, München
Deepwell-Schüttler	Vortemp 56	Labnet, Woodbridge (USA)
Elektrophorese-Apparaturen	40-0708	PeQLab, Erlangen
ELISA-Reader	Mini Protean III	BioRad, München
	Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
	Tecan Ultra	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer Beads	Hydroflex	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Frequenzzähler	PM6682	Philips, Stockholm (Schweden)
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Thermoblock	Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Typ BE400	Memmert, Schwabach
Mischgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NewYork, USA
MTP-Schüttelinkubator	Thermo Shaker PST-60H-4	Lab4you, Berlin
MTP-Schüttler	Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach
Netzgerät	EPS 301	GE Healthcare, München
	EPS 601	GE Healthcare, München
Oszillatorschaltung		Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
	Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
	e1200	BIOHIT, Helsinki (Finnland)
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand, Wertheim
Protein-A-Reinigung	Profinia Purification	BioRad, München
Quarzresonator		Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen
Rotoren	SS34 (Sorvall)	ThermoFisherScientific, Offenbach
	F9S-4×1000y	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F12S-6×500y	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F21-8×50	FIBERLite, Santa Clara (USA)
Saugpumpen	ISM 832	Ismatec, Glattbrugg (Schweiz)

Geräte	Model	Hersteller
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
	Minitron	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
	Multitron	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
SPR-Messgerät	BIAcore2000™	GE Healthcare, München
Spektrophotometer	ND1000	PeqLab, Erlangen
	Libra S11	Biochrome, Cambridge (England)
Sterilwerkbänke	MSC-Advantage	ThermoFisherScientific, Offenbach
	HERAsafe	ThermoFisherScientific, Offenbach
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Waltham (USA)
Überkopfschüttler	Rotator	GKisker, Steinfurt
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Ventilschaltung		Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig
Waagen	Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen
	E 1200 S	Sartorius, Göttingen
	A 120 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	5414 D	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Multifuge 3 S-R	ThermoFisherScientific, Offenbach
	Sorvall RC5B Plus	ThermoFisherScientific, Offenbach
	Sorvall RC6 Plus	ThermoFisherScientific, Offenbach
	Sprout	Heathrow Scientific, Illinois (USA)

II.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle II.2 aufgelistet.

Tabelle II.2: Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Typs und Herstellers.

Material	Typ	Hersteller
<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>		GE Healthcare, München
CM5-Chip		GE Healthcare, München
<i>Combitips plus</i>	1,0 mL	Eppendorf, Hamburg
Dialyserschlauch	VISKING, Typ 27/32	Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Impfösen		VWR, Darmstadt
Einmal-Spatel	L-Form	VWR, Darmstadt
Filter	0,2 µm; 0,45 µm, 0,8 µm	Sartorius, Göttingen
Mikroschraub Röhrchen	2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiter-Platten-Abdeckfolie	<i>AeraSeal, SealPlate</i>	Excel Scientific, Wrightwood USA
Mikrotiter-Platten	24-Well	Corning, New York (USA)
	96-Well, Polystyrol, Costar, 9018	Corning, New York (USA)
	96-Well,	Nunc, Wiesbaden
	Polystyrol, Maxisorp	
	96-Well,	Greiner Bio-one, Frickenhausen
	Polyspropylen	
	96-Well,	Sarstedt, Nümbrecht
	Sarstedt, 82.1581	
	96-Well, V-Bottom	Greiner Bio-one, Frickenhausen

Material	Typ	Hersteller
PCR-Reaktionsgefäße		Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	7 cm; 15 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (mit/ohne Filter)		Sarstedt, Nümbrecht
Polycarbonat Erlenmeyerkolben	125 mL, 500 mL	Corning, New York (USA)
Polypropylen-Röhrchen	15 mL; 50 mL	Corning, New York (USA)
PVDF-Membran, T830.1		Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	2,5 mL, 5 mL, 10 mL; 25 mL	Corning, New York (USA)
Reaktionsgefäße	1,5 mL; 5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	3 mm	BioRad, München

II.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

In Tabelle II.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgeführt. Nicht aufgelistete Chemikalien und Reagenzien entsprachen molekularbiologischem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), BD (Sparks, USA), Carl Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Sarstedt), Roche (Mannheim), Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm) und Serva (Heidelberg).

Tabelle II.3: Chemikalien und Kits und zugehörige Hersteller.

Produkt	Hersteller
25 mM MgCl ₂	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Antifoam 204	Sigma-Aldrich, München
Affinitätsmaterial	
<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>	GE Healthcare, München
<i>Profinity IMAC</i>	BioRad, München
<i>SUPra™ Bio-Scale™ Mini Desalting Cartridge</i>	BioRad, München
<i>SUPra™ Bio-Scale™ Mini UNOsphere</i>	BioRad, Hercules (USA)
<i>BIAcore Amine Coupling Kit</i>	GE Healthcare, München
CM5-Chip	
Ethyldichlorid (EDC) / N-Hydroxysuccinimid (NHS)	
HBS-EP-Puffer (10×)	
DNA-Ladepuffer (6×)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Marker	
<i>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Low Molecular Weight (LOW) Marker</i>	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DNA-Reinigungskits	
<i>Nucleo Spin Extract II (PCR)</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>Nucleo Spin Plasmid (Miniprep)</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>Nucleobond® Xtra (Midi/Maxi)</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I</i>	PeqLab, Erlangen
dNTPs	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Dynabeads® M-270 Carbonsäure	Invitrogen, Darmstadt
Entsalzungssäule (Desalting)	BioRad, München

Produkt	Hersteller
Enzympuffer	
<i>GoTaq</i> ®-Puffer (5×)	Promega, Mannheim
<i>Mutazyme-II</i> -Puffer (10×)	Agilent Technologies, Heilbronn
<i>Phusion</i> -Puffer (5×)	ThermoFisherScientific, Offenbach
Puffer 1–4 für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>REDTaq</i> TM PCR-Reaction Puffer (10×)	Sigma-Aldrich, Neu-Ulm
T4-DNA-Ligase-Puffer	Promega, Mannheim
<i>GeneMorph</i> ® II Random Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Heilbronn
<i>Human Capture Kit</i> (BIAcore)	GE Healthcare, München
PDEA	GE Healthcare, München
Proteinmarker	
<i>Precision Plus Protein</i> TM Unstained Standard	BioRad, München
<i>Precision Plus Protein</i> TM DualColor Prestained Std.	BioRad, München
<i>SNAP-Biotin</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>SNAP-Cell 505 Labeling Kit</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>SNAP CBG-NH₂</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>Streptavidin-HRP</i>	Dianova GmbH, Hamburg
<i>Superdex200 10/300</i>	GE Healthcare, München

II.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit gereinigtem, vollentsalztem Wasser aus einer Reinstwasser-Anlage (Sartorius, Göttingen) hergestellt. Je nach Bedarf wurden die Puffer und Lösungen zusätzlich autoklaviert. Die verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle II.4 aufgeführt.

Tabelle II.4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Allgemein		
DNA-Elutionspuffer (pH 8,5).	2,50 mM	Tris
Glycerin	80 % (v/v)	Glycerin
M-PBS-T	2,0 % (w/v)	Milchpulver in PBS
PBS (pH 7,4)	137 mM	NaCl
	2,70 mM	KCl
	8,10 mM	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O
	1,76 mM	KH ₂ PO ₄
	0,10 % (v/v)	Tween20 in PBS
PBS-T	0,10 % (v/v)	Tween20 in PBS
PBS-T für ELISA-Washer	0,05 % (v/v)	Tween20 in PBS
SNAP-Reaktionspuffer (5fach)	250 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	500 mM	NaCl
	5 mM	DTT
	0,5 % (v/v)	Tween20
Agarose-Gelelektrophorese		
Agarosegel	1,0 % (w/v)	Agarose in 1×TAE
Ethidiumbromidlösung	10 g/L	Ethidiumbromid

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM	Tris-HCl
	20 mM	Essigsäure
	2 mM	EDTA
TBE-Puffer (5fach, pH 8,0)	445 mM	Tris-HCl
	445 mM	Borat
	10 mM	EDTA
Coomassie®-Färbung		
Entfärbelösung	10 % (v/v)	Essigsäure
Coomassie®-Färbelösung	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,05 % (w/v)	Coomassie® Brilliant Blue R250
ELISA		
Stopplösung ELISA	500 mM	H ₂ SO ₄
TMB-Lösung A	30 mM	Kaliumcitrat
	1 % (w/v)	Zitronensäure; pH 4,1
TMB-Lösung B	10 mM	Tetramethylbenzidin
	10 % (v/v)	Aceton
	90 % (v/v)	Ethanol
	80 mM	H ₂ O ₂ (30%)
TMB-Substratlösung	10 Teile	TMB-A
	0,5 Teile	TMB-B
Phagenfällung		
PEG/NaCl-Lösung	20 % (w/v)	PEG 6000
	2,5 M	NaCl
<i>Phage Dilution Buffer</i> (pH 7,5)	10 mM	Tris-HCl
	20 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
kompetente Zellen		
TFB1 (pH 5,8)	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin
TFB2 (pH 8,0)	10 mM	MOP
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin
LEX™-Bioreaktor		
Kaliumphosphatpuffer (10fach)	170 mM	KH ₂ PO ₄
	720 mM	K ₂ HPO ₄
Panning		
Borat-Puffer (pH 8,5)	6,2 g/L	Borsäure
Citratpuffer	100 mM	Zitronensäure
	200 mM	Na ₂ HPO ₄
Ethanolamin	50 mM	in 1×PBS
Glycinpuffer	100 mM	Glycin
	100 mM	NaOH
Na-Acetatpuffer (pH 5,0)	10 mM	Natriumacetat

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Panningblock	1 % (w/v)	Milchpulver
	1 % (w/v)	BSA in PBS-T
Trypsinlösung	10 mg/L	Trypsin in PBS
Proteinreinigung		
IMAC-Bindepuffer (pH 8,0)	75 mM	NaPO ₄ -Puffer
	10 mM	Imidazol
	1 M	NaCl
IMAC-Waschpuffer	20 – 100 mM	Imidazol in IMAC-Bindepuffer
IMAC-Elutionspuffer I	250 mM	Imidazol in IMAC-Bindepuffer
IMAC-Elutionspuffer II	100 mM	EDTA in IMAC-Bindepuffer
Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)	947 mL	450 mM Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O
	53 mL	450 mM NaH ₂ PO ₄
PE-Puffer (pH 7,8)	20 % (w/v)	Saccharose
	150 mM	NaPO ₄ -Puffer
	1 mM	EDTA
PMSF	1 % (v/v)	100 mM PMSF in Isopropanol
Profinia™ Protein-A-Binde- und	137,0 mM	NaCl
Entsalzungspuffer (pH 7,4)	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	KH ₂ PO ₄
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
Profinia Protein-A-Elutionspuffer (pH 3,0)	100 mM	Natriumcitrat
Osmotischer-Schock (OS)-Puffer	5,0 mM	MgSO ₄
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
Acrylamidmix	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid
Laemmli-Ladepuffer (5fach)	10 % (w/v)	SDS
	50 % (v/v)	Glycerin
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,0 M	Tris-HCl; pH 8,8
SDS-Lösung	10 % (w/v)	SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS-Lösung
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M	Tris-HCl
Silbergelfärbung		
Entwicklerlösung	3 g	Na ₂ CO ₃
	25 µL	37 % (v/v) Formaldehyd
	1 mL	Natriumthiosulfatlösung
		ad 50 mL H ₂ O
Fixierlösung	50 mL	Stopplösung
	25 µL	37 % (v/v) Formaldehyd
Natriumthiosulfatlösung	10 mg	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O
		ad 50 mL H ₂ O
Silberlösung	500 µL	20 % (w/v) AgNO ₃ -Lösung
	37,5 µL	37 % (v/v) Formaldehyd
		ad 50 mL H ₂ O

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Stopplösung	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Essigsäure
Western-Blot und Immunostain		
AP-Substratpuffer	100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
	0,5 mM	MgCl ₂
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	15 g/L	in 70 % (v/v) DMF
WB-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
DAB-Färbelösung	10 mL	DAB-Substratpuffer
	200 µL	DAB (3,3'-Diaminobenzidine)
	1 µL	30 % (v/v) H ₂ O ₂
DAB-Substratpuffer	8,0 g	NaCl
	200 mg	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O
	240 mg	KH ₂ PO ₄
	0,02 % (w/v)	CoCl ₂ in PBS
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	30 g/L	in 70 % (v/v) DMF
WB-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
Zellkultur		
Polyethylenimin	1,0 mg/mL	Polyethylenimin

II.5 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE

II.5.1 Prokaryotische Kultivierung

Falls nicht anders angegeben wurde in zweifach Yeast-Trypton Medium (2×YT-Medium) kultiviert. Für Festmedien wurden 15 g/L Agar-Agar hinzugefügt. Alle verwendeten Medien und Medienzusätze wurden mit H₂O hergestellt (Tabelle II.5).

Tabelle II.5: Medien für die prokaryotische Kultivierung.

Medium	Zusammensetzung	
2×YT-Medium (pH 7,0)	1,6 % (w/v)	Trypton
	1,0 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
SOC-Medium (pH 7,0)	2,00 % (w/v)	Trypton
	0,50 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,05 % (w/v)	NaCl
	1 M	MgCl ₂
	1 M	MgSO ₄
	20 mM	Glukose
TB-Medium (pH 7,0)	1,2 % (w/v)	Trypton
	2,3 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,8 % (v/v)	Glycerin
	10 % (v/v)	Kaliumphosphatpuffer (10×)

Die Medienzusätze (Tabelle II.6) wurden als konzentrierte Stammlösung angesetzt, autoklaviert bzw. steril filtriert und dem auf unter 50 °C abgekühlten Medium unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

Tabelle II.6: Supplemente für die prokaryotische Kultivierung.

Supplemente	Stammlösung	Endkonzentration
Glukose	2,0 M	100 mM
10×GA-Lösung		
Glukose	1,0 M	100 mM
Ampicillin	2,0 mg/mL	100 µg/mL
IPTG	1,0 M	50 µM
Saccharose	2,5 M	50 mM
Ampicillin	100,0 mg/mL	100 µg/mL
Kanamycin	50,0 mg/mL	500 µg/mL
Tetracyclin	10,0 mg/mL	500 µg/mL

II.5.2 Eukaryotische Kultivierung

Alle Medien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen wurden von der Firma PAA (Pasching, Österreich) bezogen (Tabelle II.7).

Tabelle II.7: Medien für die eukaryotische Kultivierung.

Medium	Supplemente	Hersteller
F17-Medium	4,0 mM L-Glutamin	PAA, Pasching (Österreich)
	0,1 % (v/v) Pluronic F-68	AppliChem, Darmstadt
	25,0 µg/mL G418	AppliChem, Darmstadt
F17-Feeding-Medium	4,0 mM L-Glutamin	PAA, Pasching (Österreich)
	0,1 % (v/v) Pluronic F-68	AppliChem, Darmstadt
	0,1 % (w/v) Trypton N1	PAA, Pasching (Österreich)
Transfektionsmedium	F17-Medium ohne G418	PAA, Pasching (Österreich)

II.6 VERWENDETE MIKROORGANISMEN, BAKTERIOPHAGEN UND ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien sind in Tabelle II.8 aufgelistet.

Tabelle II.8: Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien mit Beschreibung und Referenz.

Name	Beschreibung / Genotyp	Referenz / Herkunft
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>Hyperphage</i>	Helferphage zur polyvalenten Präsentation von scFv	(Rondot <i>et al.</i> , 2001)
M13K07	Helferphage zur monovalenten Präsentation von scFv	(Vieira & Messing, 1987)
HEK293-6E	Humane embryonale Nierenzelllinie	(Durocher <i>et al.</i> , 2002)

II.7 ANTIKÖPERGENBIBLIOTHEKEN

Die eingesetzten Antikörpergenbibliotheken sind der nachfolgenden Tabelle II.9 zu entnehmen.

Tabelle II.9: Antikörpergenbibliotheken mit Beschreibung und Referenz.

Name	Beschreibung	Referenz / Herkunft
HAL7/8	Humane, naive, auf dem Vektor pHAL14 basierenden Antikörpergenbibliotheken	(Hust <i>et al.</i> , 2011)
Tomlinson I/J	Humane, semisynthetische, auf dem Vektor pIT2 basierenden Antikörpergenbibliotheken	(Goletz <i>et al.</i> , 2002)

II.8 PLASMIDE

In der Tabelle II.10 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tabelle II.10: Plasmide mit Beschreibung und Referenz.

Plasmid	Beschreibung	Referenz / Herkunft
pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen zur Produktion humaner scFv-Fc-Fusionen; <i>SP – MCS – C_H2 hlgG1 – C_H3 hlgG1</i>	AG Dübel
pCMX2.5-hlgG1-Fc-DF39-A4	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-A4</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCMX2.5-hlgG1-Fc-DF39-E1	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-E1</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCMX2.5-hlgG1-Fc-DF39-E11	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-E11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCMX2.5-hlgG1-Fc-DF40-B6	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF40-B6</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCMX2.5-hlgG1-Fc-DF40-G11	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF40-G11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCMX2.5-hlgG1-Fc-LA13-IIIE3	pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIIE3</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP	Expressionsvektor für Säugerzellen zur Produktion humaner scFv-Fc-Fusionen; <i>SP – MCS – C_H2 hlgG1 – C_H3 hlgG1</i>	AG Dübel
pCSE2.5-hlgG1-Fc-SNAP-XP	pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP-Derivat; Expressionsvektor für Säugerzellen zur Produktion von scFv-Fc-SNAP-Fusionen; <i>SP – MCS – C_H2 hlgG1 – C_H3 hlgG1 – SNAP</i>	(Marschall, 2011)
pHAL14	Phagemidvektor, Phagen-Display	(Kirsch <i>et al.</i> , 2008)
pHAL14-DF39-A4	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>DF39-A4</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-DF39-E1	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>DF39-E1</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-DF39-E11	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>DF39-E11</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-DF40-B6	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>DF40-B6</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-DF40-G11	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>DF40-G11</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP8-IC8	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP8-IC8</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP8-IC11	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP8-IC11</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP8-IG8	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP8-IG8</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP8-IIIE7	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP8-IIIE7</i>	Vorliegende Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz / Herkunft
pHAL14-IsP26-F11	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP26-F11</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP26-G1	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP26-G1</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-IsP27-C4	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP27-C4</i>	Vorliegende Arbeit
pHAL14-TOB5-D4	pHAL14-Derivat mit scFv-Gen <i>TOB5-D4</i>	(Al-Halabi, 2008)
pIT2	Phagemidvektor, Phagen-Display	(Goletz <i>et al.</i> , 2002)
pIT2-IsP28-C2	pIT2-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP28-C2</i>	Vorliegende Arbeit
pIT2-IsP29-C10	pIT2-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP29-C10</i>	Vorliegende Arbeit
pIT2-IsP29-H1	pIT2-Derivat mit scFv-Gen <i>IsP29-H1</i>	Vorliegende Arbeit
pIT2-LA13-IIE3	pIT2-Derivat mit scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i>	(Al-Halabi, 2008)
pOPE101-XP	Expressionsvektor für <i>Escherichia coli</i> zur Produktion von scFv-Fragmenten; <i>pelB</i> – MCS – <i>myc-tag</i> – <i>his₆-tag</i>	(Hust <i>et al.</i> , 2007b)
pOPE101-DF40-B6	pOPE101-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF40-B6</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE101-LA13-IIE3	pOPE101-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i> über NcoI und NotI kloniert	(Al-Halabi, 2008)
pOPE101-TOB5-D4	pOPE101-XP-Derivat; scFv-Gen <i>TOB5-D4</i> über NcoI und NotI kloniert	(Al-Halabi, 2008)
pOPE107-XP	Expressionsvektor, Produktion von scFv-Fragmenten mit zweifachem His ₆ -Tag; <i>pelB</i> – MCS – <i>his₆-tag</i> – <i>myc-tag</i> – <i>his₆-tag</i>	(Rülker, 2011), AG Dübel
pOPE107-DF39-A4	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-A4</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-DF39-E1	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-E1</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-DF39-E11	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-E11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-DF40-G11	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF40-G11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-IsP26-F11	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>IsP26-F11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-IsP26-G1	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>IsP26-G1</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-IsP29-H1	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>IsP29-H1</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE107-LA13-IIE3	pOPE107-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE301-XP	pOPE101-XP-Derivat; 326 bp großes <i>c_K</i> -Fragment über NotI und BamHI kloniert; <i>pelB</i> – MCS – <i>c_K</i> – <i>myc-tag</i> – <i>his₆-tag</i>	Vorliegende Arbeit
pOPE301-LA13-IIE3	pOPE301-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE301-TOB5-D4	pOPE301-XP-Derivat; scFv-Gen <i>TOB5-D4</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE401-XP	pOPE101-XP-Derivat; 320 bp großes <i>c_L</i> -Fragment über NotI und BamHI kloniert; <i>pelB</i> – MCS – <i>c_L</i> – <i>myc-tag</i> – <i>his₆-tag</i>	Vorliegende Arbeit
pOPE401-LA13-IIE3	pOPE401-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i> über NotI und NcoI kloniert	Vorliegende Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz / Herkunft
pOPE401-TOB5-D4	pOPE401-XP-Derivat; scFv-Gen <i>TOB5-D4</i> über NotI und NcoI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE-SNAP-XP	pOPE101-XP-Derivat, Expressionsvektor zur Produktion von scFv-SNAP-Fusionen <i>pelB – MCS – SNAP – myc-tag – his₆-tag</i>	Vorliegende Arbeit
pOPE-SNAP-DF39-E1	pOPE-SNAP-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF39-E1</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE-SNAP-DF40-G11	pOPE-SNAP-XP-Derivat; scFv-Gen <i>DF40-G11</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit
pOPE-SNAP-LA13-IIE3	pOPE-SNAP-XP-Derivat; scFv-Gen <i>LA13-IIE3</i> über NcoI und NotI kloniert	Vorliegende Arbeit

II.9 OLIGODESOXYNUKLEOTIDE

In der nachstehenden Tabelle II.11 sind die verwendeten Oligodesoxynukleotide aufgeführt.

Tabelle II.11: Oligodesoxynukleotide mit Sequenz und Beschreibung.

Angegeben ist der Name sowie die Sequenz in 5'–3'-Richtung und die Beschreibung des Oligodesoxynukleotids. Die Abkürzungen „f“, „fwd“ bzw. „for“ (vorwärts) und „r“ bzw. „rev“ (rückwärts) im Namen des Oligodesoxynukleotids beschreiben die Orientierung des Primers in der PCR-Amplifizierung.

Name	Sequenz (5' – 3')	Beschreibung
IIB6-Aff2-fwd	GCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCT CAGCCGGCCATGG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
IIB6-Aff2-rev	GTTCTGCGGCCCGTGATGGTGATGAT GATGAGCGGCCGC	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
CM2-f-275126	CGCAAATGGGCGGTA	Amplifikation von scFv-Genen aus dem Vektor pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP
DF-SNAP1-BamHI_rev	TCATGGGATCCCGCAGGTCCCAGACC	Amplifikation von SNAP-Genen aus dem Vektor pOPE101-XP
DF-SNAP1_NotI_for	CACATGCGGCCGCTATGGACAAAGATT GC	Amplifikation von SNAP-Genen aus dem Vektor pOPE101-XP
HT-IIB6-Aff_fwd	TGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
HT-IIB6-Aff_rev	TGATGGTGATGATGATGAGCGGCCGC	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
HT-Aff-kurz_f	CAGCTCAGCCGGCCATGG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
HT-Aff-kurz_rev	ATGATGATGAGCGGCCGC	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
HT-gIII-Beginn1-rev	TAAACAACCTTCAACAGTTTCAGCT	Mutagenisierung des scFv-Gens TOB5-D4
LA-pIT2-gIII-r1	TAAACAACCTTCAACAGTCTATGCGGC	Mutagenisierung des scFv-Gens LA13-IIE3
MHCKappa-NotI_f	CGCGTGCGGCCGCTCGAACTGTGGCTG CACC	Amplifikation von <i>c_K</i> aus pHAL20
MHCKappa-BamHI_r	CGCGTGGATCCCTCTCCCCTGTTGAAGC	Amplifikation von <i>c_K</i> aus pHAL20
MHCLambda-NotI_f	CGCGTGCGGCCGCTGGTCAGCCCAAGG CCAACC	Amplifikation von <i>c_L</i> aus pHAL21

Name	Sequenz (5' – 3')	Beschreibung
MHCLambda-BamHI_r	GACAGTTGCCCCTACGGAAGGATCCAC GCG	Amplifikation von c_{λ} aus pHAL20
MH LacZ-Pro_f	GGCTCGTATGTTGTGTGG	Amplifikation von scFv-Genen aus dem Vektor pHAL14
MHgIII_r1	CTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC	Amplifikation von scFv-Genen aus dem Vektor pHAL14
MHpOPE_f2	CTTAGATTCAATTGTGAGCGG	Amplifikation von scFv-Genen aus den Vektoren pOPE101 und pOPE107
MHpOPE_r2	CTGATCATTAGCACAGGCC	Amplifikation von scFv-Genen aus den Vektoren pOPE101 und pOPE107
MKpelB_f	GCCTACGGCAGCCGCTGG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
MKmyc_r	GATCCTCTTCTGAGATGAG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
Tor-pCMV-mlgG01-Fc-seq-f	CACTTTGCCTTTCTCTCC	Amplifikation von scFv-Genen aus den Vektoren pCMX2.5-hlgG1-Fc und pCSE2.5-hlgG1-Fc
Tor-pCMV-mlgG01-Fc-seq-r	CAGATGGCTGGCAACTAG	Amplifikation von scFv-Genen aus den Vektoren pCMX2.5-hlgG1-Fc und pCSE2.5-hlgG1-Fc
TS_6xHis_r	GTGATGGTGATGATGATGTGC	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
TS_PelB_pHAL14_f	CTGGCTTGCTGCTGCTGGCAG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4
TS_PelB_pIT_f	GTTATTACTCGCGGCCAG	Mutagenisierung der scFv-Gene LA13-IIE3 und TOB5-D4

II.10 ENZYME

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle II.12 aufgelistet.

Tabelle II.12: Enzyme unter Angabe des Herstellers.

Enzym	Hersteller
<i>CIP (calf-intestinal alkaline phosphatase)</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>GoTaq®</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Mutazyme II</i> DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Heilbronn
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	ThermoFisherScientific, Offenbach
<i>REDTaq™</i> DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, Neu-Ulm
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin	Carl Roth, Karlsruhe

II.11 ANTIGENE UND ANTIKÖRPER

Die bei der Durchführung dieser Arbeit verwendeten Antigene sind in Tabelle II.13 aufgelistet.

Tabelle II.13: Antigene mit Bezeichnung sowie Angabe des Herstellers.

Antigen	Bezeichnung	Hersteller
BSA	Rinderserum-Albumin	Sigma-Aldrich, München
CRP	humanes C-reaktives Protein	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	aus Hühnereiweiß	Carl Roth, Karlsruhe

Alle verwendeten Antikörper sind der nachfolgenden Tabelle II.14 zu entnehmen.

Tabelle II.14: Antikörper mit Bezeichnung sowie Angabe des Herstellers.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Maus- α -Lysozym (D1.3)	-	AG Dübel, Braunschweig
Maus α -BSA-IgG (HAS-11; monoklonal)	-	Sigma-Aldrich, München
Maus- α -c-myc-IgG 9E10-21 (monoklonal)	1:1.000	AG Dübel, Braunschweig
Maus α -CRP-IgG (4C28-C6; monoklonal)	1:1.000	Diasys, Holzheim
Maus α -CRP-IgG (4C28-CRP36; monoklonal)	-	Hyttest LTD, Finnland
Ziege- α -Maus-IgG-AP (Fc-spezifisch; polyklonal)	1:10.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -Maus-IgG-HRP (Fc-spezifisch; polyklonal)	1:20.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -Maus-IgG-HRP (Fab-spezifisch; polyklonal)	1:30.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -human-IgG-HRP (Fc-spezifisch, polyklonal) A0170	1:75.000	Sigma-Aldrich, München

II.12 SOFTWARE

In dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle II.15 aufgelistet.

Tabelle II.15: Software unter Angabe des Anbieters und der Verwendung.

Name	Anbieter	Verwendung
<i>BLAevaluation 4.1</i>	GE Healthcare Life Science	Auswertung von Bindungskinetiken
<i>Endnote X5</i>	http://www.endnote.com/	Paper-Verwaltung, Zitierungen
<i>FinchTV 1.4.0</i>	Geospiza Inc.	Auswertung von DNA-Sequenzen
<i>ImageJ 1.37</i>	http://rsb.info.nih.gov/jj	Proteinquantifizierung
<i>Intas Gelddocumentation</i>	Intas	Darstellung von Agarosegelen
<i>LabVIEW 7.0</i>	National Instruments	Auswertung von QCM-Messungen
<i>MultiAlign</i>	(Corpet, 1988)	Analyse von Protein- und Gensequenzen
<i>NanoDrop ND-1000</i>	Coleman Technologies	Analyse von Nukleinsäure- und Proteinkonzentrationen
<i>NCBI</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Literatur, Protein- und Gensequenzen
<i>Office 2007</i>	Microsoft	Protokolle, Zeichnungen, Grafiken, Präsentationen
<i>Unicorn 5.1</i>	GE Healthcare Life Science	Bearbeitung und Analyse von SEC-Daten
<i>VBASE2</i>	(Retter <i>et al.</i> , 2005)	Analyse von Antikörpersequenzen
<i>Vector NTI Advance® 11</i>	Invitrogen (USA)	Plasmid-Verwaltung

III METHODEN

III.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

III.1.1 Sterilisation

Jegliche verwendeten Kulturmedien (Flüssig- und Festmedien), Medienzusätze, Puffer und Lösungen wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Hitzesensitive Substanzen, wie z. B. Antibiotika, wurden steril filtriert (Porendurchmesser des Filters: 0,2 µm) und dem Medium unter sterilen Bedingungen beigegeben. Bei der Herstellung der Festmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar-Agar (Bacto) hinzugegeben.

III.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

III.1.2.1 Plattenkulturen

Zum Anlegen einer Plattenkultur wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einer 2×YT-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht (ü. N.) wurden die Platten mit sichtbaren Einzelkolonien mit Parafilm abgedichtet und konnten für bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

III.1.2.2 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen von *Escherichia coli* wurden in 2×YT-Kulturmedium mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz im Schüttelkolben ü. N. für ca. 14 – 18 h bei 37 °C und 250 rpm (Multitron, Infors) inkubiert. Beimpft wurden die Kulturen entweder mit einer Einzelkolonie von einer 2×YT-Agar-Platte oder mit wenigen Zellen aus einer Glycerinkultur. Nach der Inkubation ü. N. wurde die Bakterienkultur für die Inokulation einer Expressionskultur verwendet.

III.1.3 Lagerung von *Escherichia-coli*-Zellen

Die längerfristige Lagerung der Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen bei -80 °C. Hierzu wurden die Flüssigkulturen mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 20 % (v/v) versetzt.

III.1.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen erfolgte über photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge $\lambda = 600 \text{ nm}$ im Photometer (Biochrome,

Cambridge) gegen Kulturmedium als Referenz. Eine OD₆₀₀ von 0,5 entspricht bei *E. coli* etwa 5×10⁸ Zellen/mL.

III.1.5 Herstellung chemo-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Dafür wurden zunächst 100 mL 2×YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer *E. coli*-Kultur im Verhältnis 1:100 beimpft und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (3220×g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen, das Zellsediment in 15 mL eiskaltem TFB1 resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3220×g, 4 °C, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellsediment vorsichtig in 4 mL eiskaltem TFB2 resuspendiert. Für die längerfristige Aufbewahrung wurden Aliquots angefertigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

III.1.6 Transformation mittels Hitzeschock

Zu einem Ligationsansatz von 10 µL wurden 50 µL der auf Eis aufgetauten, chemo-kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-MRF'-Zellen gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min folgte der Hitzeschock für exakt 1 min bei 42 °C. Nach einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 100 µL SOC-Medium versetzt und anschließend direkt auf einer 2×YT-GA-Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation der 2×YT-GA-Agarplatten erfolgte ü. N. bei 37 °C.

III.1.7 Herstellung von M13-Phagen

Für die Herstellung von Antikörpergenbibliotheken oder nach Selektionen mit diesen wurden scFv-Fragment tragende M13-Phagen produziert. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 2×YT-GA Medium mit Phagemid tragenden Bakterien hergestellt. Mit dieser wurde die Hauptkultur in 30 mL 2×YT-GA-Medium inokuliert. Analog konnten nach einer Selektion von Antikörpergenbibliotheken abgeschwemmte Kolonien von Agarplatten als Inokulum dienen. Das Wachstum der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5. Fünf mL der Kultur bzw. 25 mL für die Herstellung von M13-Antikörperphagen-Bibliotheken, wurden im Verhältnis 1:20 mit M13K07-Helferphagen infiziert. Der Infektionsansatz wurde zunächst für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, danach für 30 min bei 37 °C und 250 rpm. Die Zellen wurden sedimentiert (3220×g, 20 °C, 10 min) und in 30 bzw. 400 mL 2×YT-AK-Medium aufgenommen. Nach der Produktion der Antikörperphagen ü. N. bei 30 °C und 250 rpm wurden die Zellen abgetrennt (3220×g, 4 °C, 10 min). Der Überstand enthielt die Phagen.

Bei der Selektion wurden 2 mL der Phagen-Suspension steril filtriert (Porengröße des Filters: 0,45 µm), in ein Mikroschraubröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert.

Für die Herstellung von M13-Antikörperphagen-Bibliotheken wurden die produzierten Phagen für 1 h mit 1/5 des Überstandvolumens PEG/NaCl-Lösung auf einer Wippe auf Eis gefällt. Die Phagen wurden anschließend sedimentiert (10.000×g, 4 °C, 1 h), der Überstand verworfen und die sedimentierten Phagen in 10 mL *Phage Dilution Buffer* resuspendiert. Nach Sedimentation (16.000×g; 4 °C, 30 min) verbliebener Zellen und Zelltrümmer wurden die im Überstand befindlichen Phagen erneut mit PEG/NaCl-Lösung (1/5 des Überstandvolumens) für 20 min auf der Wippe auf Eis gefällt. Anschließend wurde abermals zentrifugiert (16.000×g, 4 °C, 30 min) und das Pellet in 1 mL *Phage Dilution Buffer* resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (16.000×g, 1 min) wurde der zellfreie Überstand in Mikroschraubröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert. Die amplifizierten Phagen wurden dann sowohl zur Titerbestimmung (siehe Kapitel III.1.10) als auch für weitere Panningrunden eingesetzt.

III.1.8 Selektion mit Antikörperphagen-Bibliotheken

Zur Selektion von scFv-Fragmenten, die C-reaktives Protein (CRP) spezifischen erkennen, wurden die humanen, naiven, auf den Vektor pHAL14 basierenden Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 (Hust *et al.*, 2011) sowie die humanen, semisynthetischen, auf dem Vektor pIT2-basierenden Bibliotheken Tomlinson I und J (Goletz *et al.*, 2002) als auch die in dieser Arbeit erstellten Mini-Mutationsbibliotheken der scFv-Fragmente LA13-IIIE3 („A“) und TOB5-D4 („B“) verwendet.

III.1.8.1 Panning auf Stripes

Auf der Oberfläche der Kavitäten eines MTP-Streifens (Nunc, MaxiSorp™) wurden 1,5 µg CRP in 150 µL PBS ü. N. bei 4 °C adsorptiv immobilisiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei RT. Nach Entfernen der Antigenlösung wurden unspezifische Bindungsstellen mit M-PBS-T abgesättigt. Parallel dazu wurde zur Deselektion unspezifisch bindender scFv-Phagen eine weitere Vertiefung mit Panningblock für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift im ELISA-Washer (3×) mit PBS-T wurden pro Kavität $5 \times 10^{10} - 5 \times 10^{12}$ Phagenpartikel in 150 µL Panningblock für 1 h präinkubiert. Das deselektierte Phagengemisch wurde anschließend für 2 h in der mit CRP gekoppelten Kavität inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit PBS-T wurden schwach gebundene Phagen entfernt. In der ersten Selektionsrunde wurde zehnmal gewaschen, mit jeder weiteren Runde wurden zehn

Waschschritte hinzugefügt. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte enzymatisch mit 200 µL 10 µg/mL Trypsin für 30 min bei 37 °C.

Die eluierten Phagen wurden für eine Titerbestimmung und zur Infektion einer *E.-coli*-XL1-Blue-MRF'-Kultur, die sich in der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,5$) befand verwendet. Dazu wurden 20 mL dieser Kultur mit 190 µL der eluierten Phagen infiziert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert ($3220\times g$, 10 min), in 250 µL 2×YT-GA-Medium resuspendiert und anschließend auf einer 2×YT-GA-Agarplatte (\varnothing 15 cm) ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte ü. N. bei 37 °C.

III.1.8.2 Panning auf Beads

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Methode wurde Antigen an magnetische *Beads* gekoppelt (siehe Kapitel III.3.15).

Das Panning wurde in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Für die erste Selektionsrunde wurden 1×10^{12} Phagenpartikel in 200 µL M-PBS-T im Thermoschüttler für 15 min bei 22 °C und 900 rpm präinkubiert. In den darauf folgenden Selektionsrunden wurden 100 µL der amplifizierten Phagen der vorangegangenen Panningrunde in 50 µL M-PBS-T verwendet. Den präinkubierten Phagen-Bibliotheken wurden in der ersten Selektionsrunde je $1,5\times 10^7$ mit CRP beladene *Beads* zugegeben und im Thermoschüttler für 1,5 h bei 22 °C und 900 rpm inkubiert. Mit jeder weiteren Selektionsrunde wurde die Anzahl der zugegebenen *Beads* um 5×10^6 reduziert. Anschließend wurden die *Beads* kurz anzentrifugiert ($11.000\times g$, 10 s), magnetisch abgetrennt und der Überstand verworfen. Zum Entfernen schwach gebundener Phagen wurde fünfmal mit jeweils 1 mL PBS-T gewaschen. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte direkt auf den *Beads* enzymatisch mit 200 µL Trypsin (10 µg/mL) für 30 min bei 37 °C. Die eluierten Phagen wurden für eine Titerbestimmung und für die Infektion von *E.-coli*-Zellen zur Phagenamplifikation nach dem HTS-Protokoll (siehe Kapitel III.1.9) verwendet.

III.1.9 Amplifikation von Antikörperphagen mittels *High-throughput screening* (HTS)-Protokoll

Bei dieser Methode wurde die Infektion von *E. coli* und die Produktion der M13K07-Antikörperphagen in einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) durchgeführt (Dietrich, 2011). Dafür wurde eine *E.-coli*-XL1-Blue-MRF'-Kultur in 2×YT-Medium im Schüttelkolben bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ angezogen. Von dieser Kultur wurden je 160 µL in vier Vertiefungen einer MTP vorgelegt, mit jeweils 20 µL der eluierten Phagen infiziert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 20 µL 10×GA folgte eine Inkubation ü. N. bei 30 °C und 800 rpm. Am nächsten Tag wurden 5 – 10 µL der Bakterienkultur jeder Vertiefung

zur Inokulation von 190 – 195 μL 2 \times YT-GA-Medium verwendet und für 1,5 – 2 h bei 37 °C und 800 rpm bis zu einer $\text{OD}_{600} \approx 0,5$ inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit dem Helferphagen M13K07. Hierfür wurde je 5×10^{10} Phagenpartikel pro Vertiefung eingesetzt und der gesamte Ansatz zunächst 30 min bei 37 °C ohne Schütteln, anschließend 30 min bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert ($3220 \times g$, 10 min) und der Überstand durch Ausschlagen entfernt. Nach Resuspendieren des Zellsediments in 2 \times YT-AK-Medium erfolgte die Produktion der Phagen ü. N. bei 30 °C und 800 rpm. Die Zellsuspensionen der vier Vertiefungen wurden in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß vereinigt und die Zellen abgetrennt ($16.000 \times g$, 5 min). Der Überstand mit den Antikörperphagen wurde in ein Mikroschraubröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert. Der Titer der amplifizierten Phagen wurde bestimmt und die Antikörper-Phagen für weitere Selektionsrunden eingesetzt.

III.1.10 Titerbestimmung von M13K07-Antikörper-Phagen

Um die Zahl der infektiösen Phagen zu bestimmen, wurden *E.-coli*-XL1-Blue-MRF'-Zellen infiziert und anschließend die Anzahl der *colony forming units* (cfu) auf Selektions-Agarplatten mit verschiedenen Verdünnungen der Antikörper-Phagen ermittelt.

Zunächst wurde die *E.-coli*-XL1-Blue-MRF'-Zellen in 2 \times YT-T-Medium bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer $\text{OD}_{600} \approx 0,5$ inkubiert. Von den Phagen-Suspensionen wurden parallel Verdünnungsreihen in PBS angefertigt. Anschließend wurden jeweils 10 μL der verschiedenen Verdünnungen mit 50 μL *E.-coli*-XL1-Blue-MRF'-Zellen gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Infektion wurden von jeder Verdünnung je dreimal 10 μL bzw. der gesamte Ansatz auf einer 2 \times YT-GA-Agarplatte ausgetropft bzw. ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien und der bekannten Verdünnungsstufe konnte der Phagentiter in cfu/mL bestimmt werden.

III.1.11 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten

Für die erste Charakterisierung von anti-CRP-scFv-Klonen wurden die scFv-Fragmente zunächst im MTP-Maßstab (24-wells bzw. 96-wells) produziert. Dabei wurden Einzelkolonien von den Titerplatten der dritten Panningrunde (96-wells) bzw. Glycerinkulturen (24-wells) zur Inokulation von je 200 μL 2 \times YT-GA- oder TB-GA-Medium pro Vertiefung einer MTP verwendet. Die MTP wurde mit einer atmungsaktiven Membran abgedeckt und ü. N. bei 37 °C und 850 rpm inkubiert. Je Vertiefung einer neuen MTP wurden 190 μL (96-wells) bzw. 3,8 mL (24-wells) 2 \times TY-GA- oder TB-GA-Medium vorgelegt und im Verhältnis 1:20 mit der Übernachtskultur inokuliert. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C 850 rpm. Die

96-well-MTP mit den Übernachtskulturen wurde mit je 40 µL 80 % (v/v) Glycerin pro Vertiefung versetzt und bei -80 °C gelagert (Masterplatte).

Im Anschluss wurden die Hauptkulturen zentrifugiert (3220×g, 10 min) und der Überstand durch Ausschlagen entfernt. Die Expression wurde mit gleichen Volumina 2×YT-SA- bzw. TB-GA-Medium mit IPTG (Endkonzentration: 10 – 50 µM) induziert und erfolgte für 3 h bis ü. N. bei 18 – 30 °C und 850 rpm. Am folgenden Tag wurden die Bakterien sedimentiert (3220×g, 10 min) und die Überstände sowie die aus den Zellen präparierten scFv-Fragmente für einen indirekten ELISA eingesetzt.

III.1.12 Produktion von scFv-Fragmenten in Schüttelkolben

Für die Produktion und Reinigung größerer Mengen an scFv-Fragmenten wurden diese nach Klonierung deren Gene in die Expressionsvektoren pOPE101-XP bzw. pOPE107-XP in Schüttelkolben hergestellt. Für eine Übernachtskultur wurden 100 mL 2×YT-GA-Medium direkt aus einer Glycerinkultur beimpft und ü. N. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 400 mL 2×YT-GA-Medium mit der Übernachtskultur auf eine $OD_{600} \approx 0,1$ inokuliert. Es folgte eine Inkubation der Bakterien bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600} \approx 1,0$. Die Expression der scFv-Fragmente wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 50 µM) induziert. Es folgte eine Kultivierung für 3 h bei 25 °C bzw. 30 °C und 200 rpm. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (17.600×g, 4 °C, 15 min), die Überstände abgenommen und ggf. einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Aus den Zellpellets wurden scFv-Fragmente durch Präparation der periplasmatischen und Osmotischen-Schock-Fraktion isoliert.

III.1.13 Produktion von scFv-Fragmenten im LEX®-Bioreaktor

Sehr große Mengen an scFv-Fragmenten wurden im LEX®-Bioreaktor produziert. Die Übernachtskulturen wurden analog zur Produktion im Schüttelkolben behandelt. Als Medium wurde Phosphat-gepuffertes (P) TB-GA-Medium verwendet. Im Anschluss wurden 1,6 L vorgewärmtes TB(P)-GA-Medium mit der Vorkultur auf eine $OD_{600} \approx 0,25$ eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 mL *Antifoam* wurden die Kulturen bei 37 °C mit gleichmäßiger Begasung bis zu einer $OD_{600} \approx 4,0$ angezogen. Anschließend wurde die Expression mit einer Endkonzentration von 50 µM IPTG induziert und nach erneuter Zugabe von 0,5 mL *Antifoam* für 4 h bis ü. N. bei 18 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kultur (11.000×g, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen nach Bestimmung der Biofeuchtmasse für die Präparation der periplasmatischen und Osmotischen-Schock-Fraktion verwendet.

III.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

III.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus 2 - 4 mL einer Übernachtskultur in 2×YT-GA-Medium mittels des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (PeqLab, Erlangen) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 50 µL, auf 70 °C erhitztem Elutionspuffer (2,5 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das *Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond® Xtra Midi* (Machery und Nagel, Düren) für eine Übernachtskultur von *E. coli* (100 – 200 mL) in 2×YT-GA-Medium verwendet. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die präzipitierte DNA wurde in 250 µL, auf 70 °C erhitztem H₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

III.2.2 Amplifikation von DNA

Eine Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde über die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: *polymerase chain reaction, PCR*) erreicht (Mullis *et al.*, 1992). Für die verschiedenen Zwecke der DNA-Amplifikation sind jeweils die Zusammensetzung und der Temperaturverlauf angegeben.

III.2.2.1 Standard-PCR

Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe der *Phusion*-DNA-Polymerase (Finnzymes). Es wurden 50-µL-PCR-Ansätze mit jeweils 10 µL 5fach *Phusion*-Puffer, 1 ng Plasmid-DNA und 200 µM dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Mix angefertigt. Die Endkonzentration der hinzugefügten Primer betrug 500 nM, die der DNA-Polymerase 0,02 U/µL. Auf das Endvolumen wurde mit H₂O aufgefüllt. In Tabelle II.16 sind Zusammensetzung und verwendetes Temperaturprofil der PCR aufgeführt.

Tabelle III.1: Zusammensetzung und Temperaturprofil der Standard-PCR.

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur	Zeit[s]
Matrizen-DNA (1 ng/µL)	1,0	98	30
5× <i>Phusion</i> -Puffer	10	98	10
40 mM dNTPs (je 10 mM)	1,0	55	20
<i>Forward Primer</i> (10 pmol/µL)	2,5	72	40
<i>Reverse Primer</i> (10 pmol/µL)	2,5	72	600
<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,5	4	600
H ₂ O	32,5	16	∞

III.2.2.2 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurde für die DNA-Amplifikation eine Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte entnommen und in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Es wurde entweder die *GoTag*®- oder die *REDTaq*TM verwendet. Die Zusammensetzung eines 10-µL-PCR-Ansatzes mit dem dazugehörigen Temperaturprofil ist in Tabelle III.2 aufgeführt.

Tabelle III.2: Zusammensetzung und Temperaturprofil der Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Bakterienpellet	-	95	120
5× <i>GoTaq</i> ®-Puffer / 10× <i>REDTaq</i> TM -Puffer*	2 / 1*	94	15
40 mM dNTPs (je 10 mM)	0,2	65 [†] / 50 [‡]	20
MH LacZ Pro f [†] / MKpelB_f [‡] (10 pmol/µL)	0,5	72	140
MHglII_r1 [†] / MKmyc_r [‡] (10 pmol/µL)	0,5	72	180
<i>GoTaq</i> ® (5 U/µL) / <i>REDTaq</i> TM (1 U/µL)	0,05 / 0,02*	16	∞
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 / -*		
H ₂ O	5,95 / 7,98*		

* Bei Verwendung der *REDTaq*TM-Polymerase. † Primerset zum Nachweis von pHAL14-basierten Plasmiden,

‡ Primerset zum Nachweis von pOPE101-basierten Plasmiden.

III.2.2.3 Nested-error-prone-PCR

Die *Nested-error-prone*-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um zufällige Mutationen in den scFv-Genen LA13-IIE3 und TOB5-D4 zu erzeugen. Dafür wurde die im *GeneMorph*® II *Random Mutagenesis Kit* enthaltene *Mutazyme-II*-DNA-Polymerase eingesetzt, die eine Mutationsrate von bis zu 16 Basenpaaraustauschen pro 1000 bp und PCR erreichen (Herstellerangabe) und eine Mutationshäufigkeit von A, T → N (50,7 %) und G, C → N (43,8 %) aufweisen soll (Herstellerangabe). Die Annealing-Temperatur während der Reaktion war abhängig vom eingesetzten Primer-Set (MH LacZ Pro f + LA-pIT2-glII-r1 / HT-glII-Beginn1-rev | MKpelB_f + MKmyc_r | IIB6-Aff2-fwd + IIB6-Aff2-rev). In Tabelle III.3 sind die PCR-Zusammensetzung und das zugehörige PCR-Programm dargestellt.

Tabelle III.3: Zusammensetzung und Temperaturprofil der *Error-prone*-PCR.

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Template DNA (1 ng/µL)	1,0	95	120
10× <i>Phusion</i> -Puffer	2,5	95	60
40 mM dNTPs (je 10 mM)	0,5	65*	60
Forward Primer (10 pmol/µL)	0,5	72	70
Reverse Primer (10 pmol/µL)	0,5	72	600
<i>Mutazyme II</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µL)	1,0	16	∞
H ₂ O	19,5		

* Die Annealing-Temperatur lag bei allen Primersets bei 65 °C. Ausnahme: MKpelB_f / MKmyc_r: 55 °C.

III.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen erfolgte mit dem *NucleoSpin®Extract Kit II* (Machery Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

III.2.4 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA erfolgte photometrisch mit Hilfe des *Nanodrop ND-1000 Spektrometer* (Peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm. Eine Absorption von $A_{260} = 1$ entsprach bei reiner, doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$.

III.2.5 Enzymatische Restriktion von DNA

Um DNA-Fragmente mit definierter Größe zu erhalten, wurde Plasmid-DNA enzymatisch mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen geschnitten. Enzyme, zugehörige Puffer und Zusätze wurden zu dem Restriktionsansatz nach Herstellerangaben hinzugegeben. Die Restriktion der DNA (0,1 – 3 μg) erfolgte bei dem Temperaturoptimum der Enzyme (meist 37 °C) für bis zu 16 h. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 – 85 °C hitzeinaktiviert. Im Anschluss wurde die DNA gereinigt und gegebenenfalls dephosphoryliert. Ein typischer Restriktionsverdau ist Tabelle III.4 zu entnehmen.

Tabelle III.4: Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus.

Komponente	Volumen [μL]
DNA (0,1 – 3 μg)	<25,0
Reaktionspuffer (10 \times)	5,0
Restriktionsenzym 1 (20 U/ μL)	0,5
Restriktionsenzym 2 (20 U/ μL)	0,5
H ₂ O	ad 50

III.2.6 DNA-Dephosphorylierung

Die Religation von linearisierten DNA-Fragmenten wurde verhindert, indem dem Restriktionsansatz vor Hitzeinaktivierung der Enzyme zusätzlich zweimal 0,5 μL *Calf Intestine Phosphatase* (CIP; 10 U/ μL) zugegeben und für je 30 min bei 37 °C inkubiert wurde.

III.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1 % (w/v) Agarosegelen nach Zugabe von 25 µg/mL des DNA interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid bei einer Spannung von 70 – 140 V und einer Stromstärke von 250 – 400 mA. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit 6×Ladepuffer versetzt. Die Laufzeit variierte je nach Größe des Gels. Als Größenstandard diente der *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) mit einer Videokamera (Intas, Göttingen).

III.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Kohäsive Enden linearisierter DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Nach der Inkubation für 1 - 16 h bei 16 - 25 °C erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65 °C. Es wurden molare Verhältnisse von Insert zu Vektor von 3:1 bis 12:1 verwendet. Die Berechnung der für das Verhältnis erforderlichen DNA-Menge des Inserts erfolgt gemäß der folgenden Formel:

$$Masse_{Insert} [ng] = \frac{Masse_{Vektor} [ng] \times Länge_{Insert} [bp]}{Länge_{Vektor} [bp]} \times \text{molare Verhältnisse} \frac{Insert}{Vektor} \quad (1)$$

In der Tabelle III.5 sind die Zusammensetzungen für typische Ligationsansätze dargestellt.

Tabelle III.5: Zusammensetzung der Ligationsansätze.
Angabe sind die Zusammensetzungen für eine normale Klonierung und die Herstellung einer Antikörpergenbibliothek.

Komponente	normale Klonierung		Erzeugung von Genbibliotheken	
	Volumen [µL]	Menge	Volumen [µL]	Menge
10×Reaktionspuffer	1,0	1×	10,0	1×
T4-DNA-Ligase (5 U/µL)	0,2	1 U	0,6	3 U
Vektor-DNA	1,0 – 2,0	≈ 50 ng	10,0 – 20,0	≈ 1000 ng
Insert-DNA	2,0 – 7,0	≈ 150 ng	20,0 – 50,0	≈ 600 ng
H ₂ O	ad 10,0		ad 100,0	

III.2.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurde die Sequenzierung von DNA-Plasmiden oder PCR-Produkten bei dem Dienstleister GATC-Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

III.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

III.3.1 Präparation von scFv-Fragmenten aus dem Periplasma von *Escherichia coli*

Nach der Produktion von scFv-Fragmenten in *E. coli* wurde das Periplasma der Zellen präpariert. Hierfür wurde das Zellsediment in eiskaltem PE-Puffer in einem Verhältnis zum Kulturvolumen von 1:10 (Mikrotiter- und Schüttelkolben-Maßstab) bzw. von 1:20 (LEX®-Bioreaktor) resuspendiert. Nach der Inkubation für 20 – 120 min bei 4 °C, wurden Zellen und Zelltrümmer sedimentiert (14.000×g, 4 °C, ≥ 20 min) und der Überstand (PE = Periplasmatischer Extrakt) abgenommen. Die sedimentierten Zellen wurden gegebenenfalls mit gleichen Volumina eiskaltem Osmotischer-Schock-Puffer versetzt und analog zur Präparation des PE behandelt. Der Überstand ist dann die Osmotische-Schock-Fraktion (OS). Beide Fraktionen wurden ggf. dialysiert und für weitere Analysen (ELISA, SDS-PAGE, WesternBlot) eingesetzt.

III.3.2 Präzipitation von scFv-Fragmenten aus dem Kulturüberstand von *Escherichia coli*

Die während der Produktion in *E. coli* in den Kulturüberstand abgegebenen scFv-Fragmente wurden mit dem chaotropen Salz Ammoniumsulfat ausgefällt. Dafür wurden pro 100 mL zellfreien Kulturüberstand 40 g Ammoniumsulfat hinzugefügt und für bis zu 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (17.600×g, 4 °C, 30 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Sedimente in PBS äquivalent zu 1/30 des Kulturvolumens resuspendiert (ASF = Ammoniumsulfat gefällter Überstand) und ggf. anschließend dialysiert.

III.3.3 Dialyse

Zur Entfernung überschüssiger Salze und niedermolekularer Verunreinigungen wurden die aus dem Überstand gefällten Proteine und der PE jeweils in einen Dialyseschlauch (VISKING, Roth) transferiert und ü. N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

III.3.4 Analyse der rekombinanten Proteinproduktion

Für die Analyse der rekombinanten Proteinproduktion wurden den entsprechenden *E.-coli*-Kulturen vor und nach der Induktion der rekombinanten Genexpression in regelmäßigen Zeitabständen je zwei Proben entnommen. Die entnommenen 2-OD₆₀₀-Äquivalente wurden zentrifugiert (16.000×g, 4 °C, 2 min), die zellfreien Überstände beider Proben vereinigt und zur Proteinpräzipitation verwendet. Die sedimentierten Zellen einer Probe wurden für die Präparation des PE verwendet, während die der zweiten Probe für die Präparation der

Gesamtproteinfraktion eingesetzt wurde. Hierfür wurden die sedimentierten Zellen in jeweils 160 µL PBS resuspendiert, mit 40 µL 5×Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Die Proben wurden direkt via SDS-PAGE analysiert oder bei -20 °C gelagert.

III.3.5 IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten

Zur Reinigung rekombinanter scFv-Fragmente über den C-terminalen His₆-Tag wurde die IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*)-Methode im Batch-Verfahren verwendet. Nach der Produktion im Schüttelkolben bzw. im LEX®-Biorektor wurden die zellfreien PE- und OS-Fractionen und die ggf. gefällten Überstände zunächst vereinigt und auf final 1 M NaCl und 10 mM Imidazol eingestellt. Nach Mischen mit dem gleichen Volumen IMAC-Bindepuffer, wurde zu den Proben jeweils 0,5 – 1 mL der mit Nickel beladenen *Chelating Sepharose Fast Flow* gegeben und für 1 – 4 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Matrix wurde anschließend sedimentiert (500×g, 4 °C, 10 min) und der so erhaltene Überstand (Durchfluss; engl.: *flow through*, FT) abgetrennt. Es folgten drei Waschschrte à 5 min mit je 5 mL IMAC-Waschpuffer mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen (10 – 100 mM) und anschließender Abtrennung der Matrix. Die Elution erfolgte in drei Schritten mit je 1,5 mL, zweimal mit IMAC-Elutionspuffer I (Bindepuffer mit 250 mM Imidazol) und abschließend mit IMAC-Elutionspuffer II (Bindepuffer mit 100 mM EDTA). Von allen Fraktionen wurden Proben für eine anschließende Analyse (SDS-PAGE, Western Blot) genommen. Die Eluate wurden bei 4 °C gelagert.

III.3.6 Protein-A-Reinigung von scFv-Fc-Fragmenten über Profinia

Für die Reinigung von scFv-Fc-Fusionsproteinen aus den Kulturüberständen der Produktion in HEK293-6E-Zellen mittels Protein A wurde das *ProfiniaTM Protein Purification System* (BioRad, München) verwendet, welches eine semi-automatisierte Reinigung ermöglicht. Die Kulturüberstände wurden zunächst entgast (Porengröße des Filters: 0,45 µm) und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min über eine 1-mL-Protein-A-Säule gereinigt. Nach einem Waschschrte mit 30 Säulenvolumen Protein-A-Bindepuffer wurden die scFv-Fc-Fusionen mit vier Säulenvolumen Citratpuffer eluiert und mit einer 10-mL-Entsalzungssäule auf PBS umgepuffert. Das Eluat wurde anschließend steril filtriert, mit 0,1 % (v/v) PMSF versetzt, bei 4 °C gelagert und für weitere biochemische Analysen eingesetzt.

III.3.7 SDS-PAGE

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in einem 4 % (v/v) Sammelgel und einem 12 % (v/v) Trenngel (Tabelle III.6).

Tabelle III.6: Zusammensetzung der Polyacrylamid (PAA)-Gele für eine diskontinuierliche SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)
H ₂ O [mL]	1,00	1,3
30 % (w/v) Acrylamid-Mix [mL]	0,26	1,6
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 [mL]	0,20	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 [mL]	-	1,0
10 % SDS [μL]	15,00	40,0
10 % APS [μL]	15,00	40,0
TEMED [μL]	2,00	2,0

Für reduzierende Bedingungen wurden die Proteinproben im Verhältnis 5:1 mit 5fach Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung bei einer Stromstärke von 30 mA pro Polyacrylamid (PAA)-Gel und einer Spannung von 300 V. Der Lauf wurde beendet, sobald das Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte (ca. 45 min). Die relativen Molekülmassen unbekannter Proteine konnten durch den Vergleich mit einem Protein-Standard (BioRad, Hercules) abgeschätzt werden. Abschließend wurde das Gel mittels Coomassie®- oder Silberfärbung gefärbt oder die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und immunologisch gefärbt.

III.3.8 Coomassie®-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Das Trenngel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung in 20 mL Coomassie®-Färbelösung gegeben, kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und 10 min bei RT auf einer Wippe gefärbt. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix in Entfärbelösung inkubiert.

III.3.9 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Für den Nachweis geringer Proteinmengen wurde die Silberfärbung nach der Methode von Blum, Beier und Gross (Blum *et al.*, 1987) verwendet. Dabei wurden alle Inkubationsschritte unter Schütteln auf einer Wippe bei RT durchgeführt. Zunächst wurde das PAA-Gel für 1 h in Fixierer inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 15 min in 50 % (v/v) Ethanol. Anschließend wurde das PAA-Gel 1 min in Natriumthiosulfatlösung geschwenkt und danach dreimal für 20 s in H₂O gewaschen. Nach Inkubation in Silberlösung für 20 min wurde erneut zweimal mit H₂O für je 20 s gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation in

Entwicklerlösung bis zum Sichtbarwerden der Banden (1 – 5 min). Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurde die Reaktion mit Stopplösung beendet.

III.3.10 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots im *Semi-dry*-Verfahren wurden zuvor durch eine SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurden zunächst drei in WB-Laufpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere luftblasenfrei auf die Elektrodenplatte gelegt. Es folgte die in Methanol aktivierte PVDF-Membran auf die das PAA-Gel gelegt wurde. Anschließend folgten drei weitere Filterpapiere. Der Transfer der Proteine erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von 330 mA pro Gel.

III.3.11 Immunfärbung

Mittels Immunfärbung wurden die auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran zunächst zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C in M-PBS-T auf einer Wippe inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Die Membran wurde für 1 h mit einem proteinspezifischen Erstantikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschrte, einmal kurz mit PBS, einmal 5 min mit PBS-T und erneut kurz mit PBS. Anschließend wurde der Zweitantikörper für 1 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten wurde die Membran für 10 min in AP-Substratpuffer äquilibriert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über eine Inkubation in AP-Substratlösung (NBT/BCIP je 1:100 in AP-Substratpuffer) bis zum Sichtbarwerden der Banden. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit H₂O abgestoppt, die Membran getrocknet und dokumentiert.

III.3.12 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Aktivität von anti-CRP-Antikörper-Phagen nachzuweisen, produzierte scFv-Fragmente miteinander zu vergleichen und deren Konzentrationen zu bestimmen. Dabei kamen sowohl ELISAs auf MTPs als auch auf *Beads* zum Einsatz.

III.3.12.1 Antigen-ELISA auf MTP

Bei dem Antigen-ELISA wurden jeweils 100 ng des jeweiligen Antigens in 100 µL PBS zu je einer Vertiefung einer MTP (Nunc MaxiSorp™ oder Corning Costar®) gegeben und ü. N. bei 4 °C inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Nach Entfernen der Antigenlösung durch Ausschlagen wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von

46

300 μL M-PBS-T je Vertiefung für mindestens 1 h abgeblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T im ELISA-Wascher (Columbus Plus, Tecan) wurden die antikörperfragmenthaltigen Produktionsüberstände oder entsprechende Verdünnungen gereinigter Antikörperfragmente für 1,5 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift im ELISA-Wascher (3mal, PBS-T) folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h. Auf einen erneuten Waschschrift im ELISA-Wascher folgte die Inkubation mit dem zweiten Nachweisantikörper für 1 h. Nach Waschen der MTP im ELISA-Wascher wurden 100 μL der Substratlösung (TMB-A + TMB-B, Verhältnis 21:1) inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte für 3–15 min bis zu einer ausreichenden Blaufärbung der Lösung und wurde dann mit 100 μL 1 N Schwefelsäure (Farbumschlag: blau zu gelb) je Vertiefung gestoppt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 450 \text{ nm}$ gegen die Absorption bei der Referenzwellenlänge von $\lambda = 620 \text{ nm}$ im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan) bestimmt.

III.3.12.2 ELISA auf Beads

Im Unterschied zu dem Antigen-ELISA auf MTP wurde das Antigen bei dem ELISA auf *Beads* nicht an der Oberfläche einer MTP, sondern an magnetischen Carboxy-*Beads* (Invitrogen, Darmstadt) immobilisiert. Je Vertiefung wurden 0,5 μL ($\triangleq 5 \times 10^5$ *Beads*) der mit Antigen gekoppelten Carboxy-*Beads* verwendet. Die *Beads* wurden entsprechend Kapitel III.3.15 vorbereitet und lagen bereits geblockt vor. Daher wurden die 0,5 μL Carboxy-*Beads* direkt in je 100 μL der Lösung mit den nachzuweisenden Antikörper-Fragmenten gegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zum Antigen-ELISA auf MTP. Die Waschschriffe wurden auf einem speziellen *Bead*-ELISA-Washer (Hydroflex, Tecan) mit einer Magnetplatte durchgeführt.

III.3.13 Quantifizierung von Proteinen

Neben der photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit Hilfe des *Nanodrop ND-1000 Spektrometer* (PeqLab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ wurden zwei weitere Verfahren eingesetzt: die densitometrische Bestimmung und die Quantifizierung mittels ELISA.

III.3.13.1 Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist die densitometrische Auswertung von Proteinbanden in einem mit Coomassie® gefärbten PAA-Gel. Dabei wurden die Farbintensitäten verschiedener Verdünnungen eines Proteinstandards (TM44-C7.3-scFv) mit denen der Proteinproben verglichen. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden der eingescannten PAA-Gele erfolgte mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Bei

diesem Programm wurden die Farbintensitäten der Proteinbanden als Histogramme dargestellt. Aus den Peakflächen der Verdünnungsreihe des Proteinstandards wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit der die Konzentration der scFv-Fragmente bestimmt werden konnte.

III.3.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist die Durchführung eines Titrations-ELISAs mit einem definierten Proteinstandard (TM44-C7.3-scFv). Dabei wurde sowohl der Proteinstandard (200 ng in der ersten Kavität), als auch die Proben mit unbekannter Konzentration in einer 1:2-Verdünnungsreihe aufgetragen. Der ELISA wurde nachfolgend analog zu Kapitel III.3.12 entwickelt und gefärbt. Aus den $A_{450-620}$ -Werten des Proteinstandards und dessen bekannten Konzentrationen wurde eine Kalibriergerade erstellt. Mit Hilfe dieser konnten dann die unbekannten Proteinkonzentrationen berechnet werden.

III.3.14 Überprüfung der SNAP-Tag-Aktivität

Für die Überprüfung der SNAP-Tag-Aktivität von scFv-SNAP-Fusionsproteinen wurden diese in SNAP-Reaktionspuffer mit verschiedenen Konzentrationen (5 – 10 μ M) des Substrat SNAP-Biotin (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) für 30 – 60 min bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mittels Streptavidin-HRP (Dianova, Hamburg) nachgewiesen.

III.3.15 Kopplung von CRP an magnetische Beads

In dieser Arbeit wurden die *Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid* (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Die Kopplung von CRP bzw. BSA mittels EDC/NHS fand nach Angaben des Herstellers statt. Für drei Selektionsrunden mit vier Antikörperphagen-Bibliotheken wurden insgesamt $1,25 \times 10^8$ Carboxy-Beads (Stock 2×10^9 /mL in DMF) für die Kopplung mit dem Antigen eingesetzt. Die Beads wurden nach den Kopplungs- und dem Blockschritten in 130 μ L PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Überprüfung der Kopplung erfolgte über eine SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung.

III.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

III.4.1 Kultivierung von HEK293-6E-Zellen

Die Suspensionszellen HEK293-6E wurden in Polycarbonat-Erlenmeyerkolben (Corning, New York, USA) in Zelllinien-spezifischen Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 110 rpm kultiviert.

III.4.2 Transfektion von HEK293-6E-Zellen

Für die transiente Expression in HEK293-6E-Zellen, wurden diese mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Die Transfektion erfolgte bei einer Zelldichte von $1,5 - 2 \times 10^6$ pro mL mit einem DNA-PEI-Komplex. Für die Vorbereitung des DNA-PEI-Komplexes wurden zunächst 25 µg der DNA und 62,5 µL einer 1,0 mg/mL PEI-Lösung zu jeweils 1,25 µL des Transfektionsmediums gegeben und vorsichtig vermischt. Die PEI-Lösung wurde zu der DNA-Lösung pipettiert, vorsichtig vermischt und für 20 min inkubiert. Die DNA-PEI-Lösung wurde anschließend zu 25 mL Zellen im Schüttelkolben gegeben und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 110 rpm inkubiert. Nach 48 h wurde zu den Zellen F17-Feeding-Medium (50 % des Kulturvolumens) gegeben, um die Produktion und die Lebensdauer der Zellen zu verlängern. Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 96 h durch Zentrifugation (1.000×g, 10 min). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und anschließend zur Protein-A-Reinigung verwendet.

III.5 BIOPHYSIKALISCHE METHODEN

III.5.1 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (engl.: *Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde mit Hilfe eines ÄKTA-Purifier-Systems durchgeführt. Es wurde eine vom Hersteller gepackte Säule *Superdex200 10/300 GL* (GE Healthcare, München) verwendet. Für die Messungen wurden mindestens 60 µg des jeweiligen Antikörperfragments in einem Volumen von ca. 200 µL mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min aufgetrennt. Der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm wurde ausgewertet.

III.5.2 Bestimmung der Bindungskinetiken von scFv-Fragmenten

Die Dissoziationskonstante (K_D) von scFv-Fragmenten wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *Surface Plasmon Resonance*, SPR) an einem *BIAcore2000TM*-Messgerät bestimmt. Dazu wurde ein dextranbeschichteter *BIAcore CM5 Chip* über eine Aminokopplung kovalent mit dem Liganden CRP beladen. Die Aktivierung des Chips erfolgte mit 100 mM NHS und 400 mM EDC nach Angaben des Herstellers. Für die Kopplung von CRP an den CM5-Chip wurde eine CRP-Konzentration von 2,5 µg/mL in 10 mM Natriumacetat (pH 4,5) eingesetzt und der Chip abschließend mit 1 M Ethanolamin abgesättigt. Als Laufpuffer diente HBS-EP-Puffer. Die Regenerationsschritte wurden mit 25 mM HCl (pH 1,6) durchgeführt. Es wurde ein Volumen von 50 µL pro Probe und Messung mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 µL/min injiziert. Es wurden verschiedene scFv-Konzentrationen (0 nM; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM und 100 nM) vermessen. Die Auswertung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Kinetiken unter Verwendung des Fittings mit dem kleinsten χ^2 -Wert erfolgte mit der Evaluationssoftware *BIAevaluation 4.1* (GE Healthcare, München).

III.5.3 Bestimmung der Bindungskinetiken von scFv-hlgG1Fc-Antikörpern

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) von scFv-Fc-Fusionsproteinen wurde das *Human Capture Kit* (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 µL/min in HBS-EP-Puffer eingesetzt. Von den scFv-Fc-Fusionsproteinen wurden jeweils 50 µL (5 µg/mL) an den Chip gekoppelt und nach Zugabe von je 250 µL einer CRP-Lösung verschiedener Konzentrationen (0 nM; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM und 100 nM) vermessen. Die Regeneration erfolgte mit je 25 µL 3 M $MgCl_2$. Die Auswertung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Kinetiken unter Verwendung

des Fittings mit dem kleinsten χ^2 -Wert erfolgte mit der Evaluationssoftware *BIAevaluation 4.1* (GE Healthcare, München).

III.5.4 Bestimmung der Affinität von scFv-SNAP-Fusionsproteinen

Für die Bestimmung der Affinität von scFv-SNAP-Fusionsproteinen wurde ein dextranbeschichteter *BIAcore CM5 Chip* analog zu III.5.2 aktiviert. Die Kopplung des Liganden *SNAP CBG-NH₂* erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis ein ausreichend hohes Signal (RU) erreicht wurde. Es folgte das Absättigen verbliebener reaktiver Gruppen mit 1 M Ethanolamin. Die Kopplung des scFv-SNAP-Fusionsproteins erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 4 h bei 25 °C. Im Anschluss daran wurden verschiedene CRP-Messungen durchgeführt. Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit der Evaluationssoftware *BIAevaluation 4.1* (GE Healthcare, München).

III.5.5 Kopplung von Antikörperfragmenten an Gold über SAM

Zur Kopplung von Antikörperfragmenten an die Goldoberfläche einer Quarzkristallmikrowaage (engl.: *Quartz Crystal Microbalance*, QCM) über einen Glutardialdehyd-SAM (*Self Assembling Monolayer*), wurde die Oberfläche zunächst dreimal mit H_2O gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einer 20 mM Cystamin-Lösung ü. N. bei RT. Nach dreimaligem Spülen mit H_2O wurde für 2 h mit 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd inkubiert. Es wurde erneut dreimalig mit H_2O gespült, bevor die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte.

III.5.6 Messungen von Antigenen aus einer Lösung mit einer Quarzkristallmikrowaage

Messungen verschiedener Antigene (CRP, BSA und Lysozym) mit Hilfe Antigen-spezifischer QCM-Sensoren wurden zum Teil am Institut für Mikrotechnik der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Hierfür wurde ein Quarzresonator partiell auf die gewünschte Dicke nassgeätzt, um eine Resonanzfrequenz f_0 von etwa 20 MHz zu erreichen. Der Quarzresonator wurde in ein Fließsystem integriert, das softlithographisch aus dem Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt wurde. Antikörperfragmente wurden mittels Glutardialdehyd-SAM auf der Goldoberfläche des Quarzresonators im Fließsystem immobilisiert. Anschließend wurde die Sensoroberfläche mit Casein abgesättigt. Nach Laufpufferfluss bis zu einer konstanten Basislinie wurden die Messungen bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 34 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Für die Messungen auf dem Sensor wurde eine selbstgebaute Oszillatorschaltung eingesetzt. Die Frequenz wurde mit einem Frequenzzähler gemessen und mit *LabVIEW 7.0* (National Instruments, USA) aufgenommen. Die eingesetzten Lösungen wurden mit einer selbstgefertigten Ventilschaltung und einer

Schlauchpumpe im Wechsel über die Sensoroberfläche geleitet. Dabei kamen elektromagnetische 3-Wege-Ventile zum Einsatz. Die Auswertung und Visualisierung der Messungen erfolgte manuell mit *MS Excel*. So wurden bspw. extreme Frequenzsprünge bedingt durch Störungen des Sensor-System wie z. B. Luftblasen oder Erschütterungen korrigiert. Für die Auswertung und Analyse der QCM-Messungen wurden zum Teil nachfolgende mathematische Korrekturen angewandt. Im Falle der scFv-Fragmente LA13-IIIE3 und DF39-E1 wurde für die Abschätzung der maximal möglichen Anzahl der Messzyklen eine Normierung durchgeführt. Dafür wurde die einzelnen gemessenen Frequenzänderungen auf Δf bei 250 $\mu\text{g/mL}$ normiert und als einzelne Wiederholung aufgetragen. Bei der Auswertung der über mehrere Messtage verteilten 100 Messzyklen mit Hilfe des TOB5-D4-scFv-Fragments wurde eine Normalisierung durchgeführt, um die einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können. Hierfür wurde für jeden einzelnen Messtag zunächst der jeweils kleinste gemessene Frequenzunterschied (Δf) von den jeweils anderen gemessenen Δf -Werten subtrahiert (der kleinste Wert wurde somit stets auf „0“ gesetzt). Anschließend wurden diese Differenzen durch den jeweils maximal gemessene Frequenzänderung dividiert, bei Mehrfachmessungen wurde durch den Mittelwert dieser Messungen geteilt (der/die größte(n) Wert(e) wurde somit auf ≈ 1 gesetzt). Die so ermittelten relativen Frequenzänderungen Δf_{Rel} wurden abschließend gegen die jeweils vermessene CRP-Konzentration aufgetragen.

IV ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung eines, im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 578 „Vom Gen zum Produkt“ etablierten, regenerierbaren, mikrofluidischen *Lab-on-a-Chip*-Systems zur spezifischen Diagnostik von C-reaktivem Protein (CRP). Für die Verbesserung der CRP-Detektion durch rekombinante Antikörperfragmente mit Hilfe einer Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) werden mindestens zwei verschiedene Antikörperfragmente mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften benötigt. Das erste Antikörperfragment muss dabei CRP in einer Anreicherungszone sehr spezifisch aus dem Blutserum binden. Nach Entfernen sämtlicher störender Serumbestandteile wird das CRP von diesem Antikörperfragment eluiert und in die eigentliche Detektionszone geleitet. In dieser ist auf der Goldoberfläche der QCM ein zweites Antikörperfragment immobilisiert, das in der Lage sein muss, das ggf. partiell denaturierte CRP in dem verwendeten Elutionspuffer stabil zu binden. Darüber hinaus müssen beide Antikörperfragmente langzeitstabil und regenerierbar sein, um mehrere aufeinanderfolgende CRP-Messungen zu ermöglichen.

Um die Anzahl der möglichen Messzyklen zu steigern und die CRP-Sensitivität zu erhöhen, wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Zunächst sollten bereits vorhandene CRP-spezifische scFv- (*single chain fragment variable*) Fragmente zum einen in andere Antikörper-Formate überführt werden, um die Stabilität und Affinität dieser Fragmente zu erhöhen. Zum Anderen sollten sie mutagenisiert werden, um CRP-spezifischen scFv-Fragmente mit veränderten Eigenschaften (z. B. erhöhter pH-Stabilität) zu erhalten. Des Weiteren erfolgten neue Selektionen gegen CRP, um Antikörperfragmente zu generieren, die *per se* andere biochemische Eigenschaften (z. B. pH-Toleranz oder Erkennung anderer Epitope) aufweisen. Die veränderten Antikörper-Varianten und -Formate sowie neu identifizierte Antikörperfragmente wurden anschließend hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (Affinität, Stabilität) charakterisiert und für den Einsatz in einem QCM-basierten *Lab-on-a-Chip*-System untersucht. Darüber hinaus sollte die Kopplung von Antikörperfragmenten an die Goldoberfläche der QCM optimiert werden.

IV.1 ERSTELLUNG VON scFv-C_κ/C_λ-ANTIKÖRPERFRAGMENTEN

Durch die Fusion der bereits vorhandenen scFv-Fragmente LA13-IIE3 und TOB5-D4 (Al-Halabi, 2008) mit den konstanten Domänen der leichten Kette Kappa (C_κ) oder Lambda (C_λ) sollte die Stabilität dieser Antikörperfragmente erhöht werden, wodurch die Anzahl der CRP-Messzyklen mit dem QCM-Sensor gesteigert werden könnte. Durch die Fusion sollte zudem die Produktionsausbeute erhöht werden. So konnte die scFv-Produktion mit zellfreiem *E.-coli*-S30-Zelllysate durch C_κ-Fusion signifikant gesteigert werden (Palmer *et al.*, 2006). Ähnliche Resultate wurden bei der Produktion von scFv- und scAb- (*single chain antibodies*) Fragmenten in Insektenzellen erhalten (Reavy *et al.*, 2000).

IV.1.1 Konstruktion von scFv-C_κ/C_λ-Expressionsvektoren

Zur Produktion von C_κ/C_λ-Fusionsproteinen wurden zunächst die Expressionsvektoren pOPE301-XP (C_κ) und pOPE401-XP (C_λ) erstellt. Hierfür wurden die Gene, die für die konstante Domäne der leichten Kette Kappa (C_κ) und Lambda (C_λ) kodieren, mittels PCR aus den Vektoren pHAL20 (C_κ) bzw. pHAL21 (C_λ) mit den Primern MHCKappa-NotI_f | MHCKappa-BamHI_r (C_κ-Gen) bzw. MHCLambda-NotI_f | MHCLambda-BamHI_r (C_λ-Gen) amplifiziert und mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NotI und BamHI in den Expressionsvektor pOPE101-XP kloniert. Im Anschluss daran wurden die Gene, die für die beiden scFv-Fragmente LA13-IIE3 bzw. TOB5-D4 kodieren, mittels PCR aus den jeweiligen Vektoren pIT2-LA13-IIE3 bzw. pHAL14-TOB5-D4 mit Hilfe des Primerpaares MKmyc_r | MKpelB_f amplifiziert und anschließend über NcoI/NotI in die neu erstellten Expressionsvektoren subkloniert.

IV.1.2 Produktion verschiedener scAb- und scFv-Fragmente

Um den Einfluss der Fusion der unterschiedlichen konstanten Domänen der leichten Ketten C_κ und C_λ an die jeweiligen scFv-Fragmente auf die rekombinante Proteinproduktion zu untersuchen, wurden die verschiedenen *E.-coli*-XL1-Blue-Klone kultiviert und die rekombinante Genexpression mit IPTG induziert. Vor und nach der Induktion wurden den jeweiligen Kulturen Proben für nachfolgende Analysen entnommen.

In den jeweiligen Gesamtproteinfraktionen konnten bereits 3 h nach Induktion entsprechende scAb- (M_r ≈ 45.000) bzw. scFv-Fragmente (M_r ≈ 30.000) nachgewiesen werden, wobei die Fusion an C_κ und C_λ zu einer Steigerung der Produktionsausbeute führte (Abbildung IV.1).

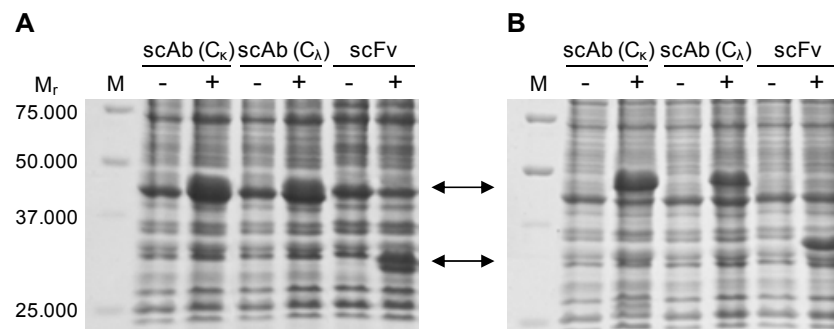


Abbildung IV.1: Nachweis der Produktion verschiedener scAb/scFv-Fragmente.

Dargestellt sind die Gesamtproteinfraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten vor (-) und nach Induktion (+) der rekombinanten Genexpression unterschiedlicher scAb- bzw. scFv-Fragmente: LA13-IIE3 (A) und TOB5-D4 (B). Es konnten signifikante Mengen an scAb- bzw. scFv-Fragmenten nachgewiesen werden (schwarze Pfeile). Als Proteingrößenstandard wurde der *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad, München) verwendet. Die Färbung der Proteine erfolgte mit *Coomassie® Brilliant Blue R250*.

IV.1.3 Aktivitätsanalyse der scAb- und scFv-Fragmente

Für die Überprüfung der Aktivität der verschiedenen scAb- und scFv-Fragmente und den Vergleich miteinander wurden diese mittels IMAC gereinigt und die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen densitometrisch bestimmt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden jeweils 350 nM scAb- bzw. scFv-Fragment in einem Titrations-ELISA eingesetzt (Abbildung IV.2).

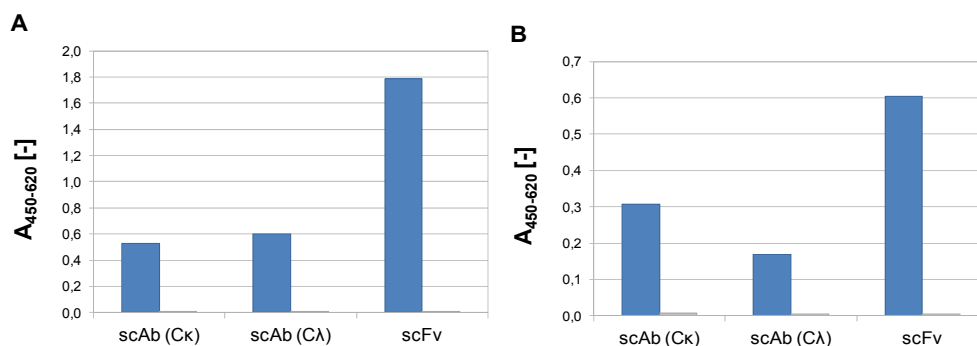


Abbildung IV.2: Nachweis der CRP-spezifischen Aktivität verschiedener scAb- bzw. scFv-Fragmente.

Jede Vertiefung wurde mit je 100 ng CRP (■) bzw. BSA (□) beschichtet. Nach der Produktion und IMAC-Reinigung wurden jeweils 350 nM der verschiedenen scAb- bzw. scFv-Fragmente LA13-IIE3 (A) bzw. TOB5-D4 (B) auf den Antigenen inkubiert. Der Nachweis erfolgte über *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und das Antikörper-HRP-Konjugat *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch) mittels Tetramethylbenzidin (TMB).

Durch den Einsatz identischer Konzentrationen gereinigter scAb- bzw. scFv-Fragmente konnte der Einfluss unterschiedlicher Produktionsraten beseitigt und die Bindungseigenschaften der Fragmente direkt miteinander verglichen werden. Dabei zeigten die scFv-Fragmente gegenüber den jeweiligen C_κ/C_λ-Fusionsproteinen deutlich höhere ELISA-Signale (Faktor 2 – 3). Die Fusion von scFv-Fragmenten an die konstante Domäne der leichten Kette C_κ bzw. C_λ führte zu einer Steigerung der Produktionsrate (). Jedoch konnte bisher keine erhöhte Bindung an CRP nachgewiesen werden.

IV.2 PANNING MIT CARBOXY-BEADS GEGEN CRP UNTER VERWENDUNG VIER UNTERSCHIEDLICHER ANTIKÖRPERPHAGEN-BIBLIOTHEKEN

Zur Selektion von CRP-spezifischen scFv-Fragmenten mit anderen, biochemischen Eigenschaften wurden mit einem Panning auf *Beads* mit vier unterschiedlichen Antikörperphagen-Bibliotheken neue CRP-Binder identifiziert. Es wurden sowohl die beiden naiven Antikörperphagen-Bibliotheken HAL7 und HAL8 als auch die beiden semi-synthetischen Bibliotheken Tomlinson I und Tomlinson J eingesetzt. Während die naiven Bibliotheken HAL7 und HAL8, bei denen aus humanen Lymphozyten isolierte Antikörper-Gensegmente zufällig kombiniert wurden, eine Diversität von ca. 5×10^9 aufweisen (Hust *et al.*, 2011), zeigen die humanen, semisynthetischen Bibliotheken Tomlinson I und Tomlinson J mit randomisierten CDRs eine Diversität von $1,4 \times 10^8$ (Goletz *et al.*, 2002).

IV.2.1 Selektion von CRP-spezifischen Antikörper-Fragmenten

Für die Selektion von Antikörper-Fragmenten wurden $50 \mu\text{g}$ CRP kovalent an $1,25 \times 10^8$ Carboxy-*Beads* (Dynabeads® M-270, Invitrogen) gebunden. Dabei wurden in der ersten Selektionsrunde zu jeder Antikörperphagen-Bibliothek $1,5 \times 10^7$ mit CRP beladene *Beads* zugegeben. Mit jeder weiteren Runde wurde die Anzahl der zugegebenen *Beads* um 5×10^6 reduziert, um eine Anreicherung von spezifischen Bindern zu gewährleisten. Die eluierten Phagen (Tabelle IV.1) wurden mit Hilfe des Helferphagen M13K07 amplifiziert.

Tabelle IV.1: Übersicht über die eluierten Phagen.
Dargestellt sind die Titerbestimmungen der eluierten Phagen der verschiedenen Panningrunden (PR). Die Phagenzahl ist in cfu/mL angegeben.

Bibliothek	Eluierte Phagen [cfu/mL]		
	1. PR	2. PR	3. PR
HAL7	$2,3 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
HAL8	$1,6 \times 10^6$	$6,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^8$
Tomlinson I	$6,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$
Tomlinson J	$8,6 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$

Zur Identifizierung monoklonaler Binder gegen CRP wurden aus der dritten Selektionsrunde jeweils 92 Einzelkolonien ausgewählt, diese kultiviert und lösliche Antikörper-Fragmente produziert. Die Produktionsüberstände wurden sowohl in einem monoklonalen Antigen-ELISA auf Mikrotiter-Platten (MTPs) als auch auf *Beads* überprüft.

Bei der Antikörperphagenbibliothek HAL7 konnten Binder identifiziert werden, die bei beiden ELISAs (MTP- und *Bead*-ELISA) ein positives $A_{450-620}$ -Signal aufwiesen. Des Weiteren wurden Binder isoliert, die entweder nur an MTP immobilisiertes oder an *Beads* gekoppeltes CRP binden. Bei den anderen Antikörperphagenbibliotheken HAL8, Tomlinson I und Tomlinson J

konnten ausschließlich Binder identifiziert werden, die an *Beads* gekoppeltes CRP erkennen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Vielzahl an monoklonalen Bindern wurde zunächst mittels Kolonie-PCR überprüft, welche Klone ein vollständiges scFv-Genfragment enthielten. Anschließend wurde zur weiteren Charakterisierung mit den in der Kolonie-PCR positiven Klonen eine enzymatische Restriktion mittels BstNI durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Nach Auswertung des BstNI-Restriktionsverdaus wurden insgesamt 36 scFv-Klone ausgewählt, sequenziert und die CDRs mit *VBase2* analysiert (Daten nicht gezeigt). Aus der HAL8-Bibliothek konnte ausschließlich der bereits bekannte Binder TOB5-D4 isoliert werden, während aus der Tomlinson-I-Bibliothek ein neuer Klon (IsP28-C2) identifiziert werden konnte. Aus den Antikörperphagen-Bibliotheken HAL7 und Tomlinson J konnten sogar jeweils zwei Klone (IsP26-F11 und IsP26-G1 bzw. IsP29-C10 und IsP29-H1) mit unterschiedlichen Sequenzen identifiziert werden. Alle Sequenzunterschiedlichen Klone wurden zudem mit den bereits bekannten CRP-spezifischen Bindern LA13-IIC3, LA13-IID4, LA13-IIE3 und TOB5-D4 (Al-Halabi, 2008) verglichen. Bis auf den IsP27-C4, der sequenzidentisch mit dem TOB5-D4 ist, konnten somit fünf neue Binder identifiziert werden (Tabelle IV.2).

Tabelle IV.2: Bioinformatische Analyse neu isolierter CRP-Binder.

Bioinformatische Analyse der anti-CRP scFv-Klone aus der Antikörperselektion mit auf *Beads* immobilisiertem CRP. Gesonderte Darstellung der identifizierten Keimbahnlinien für V_H- und V_L-Regionen. Die Keimbahnlinien wurden mit der Datenbank VBASE2 bestimmt. *Sequenzidentisch mit TOB5-D4, daher keine weitere Charakterisierung.

Name	Antikörpergen-Bibliothek	Keimbahnlinie				
		V V _H	D V _H	J V _H	V V _L	J V _L
IsP26-F11	HAL7	IGHV3-15*01	IGHD1-26*01	IGHJ3*02	IGLV1-40*01	IGLJ3*01
IsP26-G1	HAL7	IGHV5-51*01	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
IsP27-C4*	HAL8	IGHV072	IGHD1-14*01	IGHJ3*02	IGLV2-8*01	IGLJ3*01
IsP28-C2	Tomlinson I	IGHV3-23*03	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	IGKV1D-39*01	IGKJ1*01
IsP29-C10	Tomlinson J	IGHV3-23*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	IGKV1D-39*01	IGKJ1*01
IsP29-H1	Tomlinson J	IGHV3-23*01	IGHD6-25*01	IGHJ4*02	IGKV1D-39*01	IGKJ1*01

IV.2.2 Proteinbiochemische Analyse CRP-spezifischer scFv-Fragmente

Zunächst wurde die spezifische CRP-Bindung aller Klone nach Produktion in MTPs (24-Well-Format) in einem Titrations-ELISA (in MTP und auf *Beads*) überprüft und bis auf den IsP28-C2 verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die verbliebenen vier scFv-Fragmente IsP26-F11, IsP26-G1, IsP29-C10 und IsP29-H1 wurden anschließend im Großmaßstab produziert. Dafür wurden die jeweiligen scFv-Gene aus den Phagemidvektoren pHAL14 bzw. pIT2 in den Expressionsvektor pOPE107-XP (Rülker, 2011) subkloniert. Nach der Produktion im Schüttelkolben für 3 h wurden die löslichen scFv-Fragmente aus dem Periplasma (PE, OS) isoliert und mittels IMAC gereinigt. Dabei konnten mit Ausnahme des IsP29-C10-scFv-Fragments Fragmente mit einer relativen

Molekülmasse von ≈ 30.000 in den Elutionsfraktionen E1–E3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für nachfolgende vergleichende proteinbiochemische Analysen wurden die Konzentrationen der scFv-Fragmente nach Vereinigung der Elutionsfraktionen sowohl densitometrisch als auch mittels ELISA bestimmt (Tabelle IV.3).

Tabelle IV.3: Proteinkonzentrationen der neu identifizierten gereinigten scFv-Fragmente.
Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dabei densitometrisch* und mittels ELISA[†]. Anhand der Mittelwerte beider Konzentrationsbestimmungen konnte über das Elutionsvolumen auf die Proteinausbeute pro Liter Kulturvolumen geschlossen werden. Experiment wurde in Kooperation mit Popp (2011) durchgeführt.

scFv	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Elutionsvolumen [mL]	Ausbeute scFv/Kulturvolumen [mg/L]
IsP26-F11	279* 215 [†]	3	1,9
IsP26-G1	297* 281 [†]	3	2,2
IsP29-H1	161* 162 [†]	3	1,2

IV.2.2.1 Nachweis der spezifischen CRP-Bindung neu identifizierter scFv-Fragmente

Um die gereinigten scFv-Fragmente hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurden sie in einem Titrations-ELISA miteinander verglichen.

Für das scFv-Fragment IsP26-G1 konnte eine CRP-spezifische Bindung gezeigt werden, wobei die halbmaximale Absorption bei einer Konzentration von 0,8 nM erreicht wird. Im Gegensatz dazu konnte für die beiden scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 keine Bindung an immobilisiertes CRP nachgewiesen werden (Abbildung IV.3).

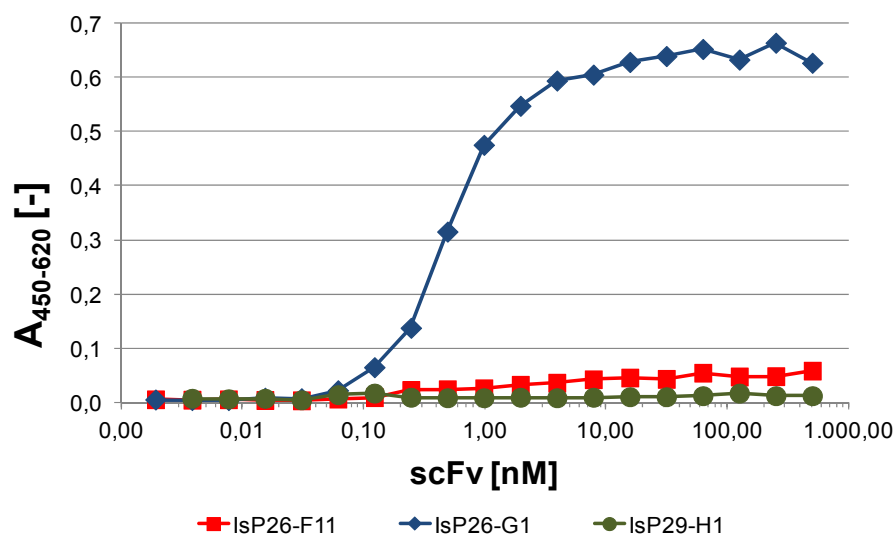


Abbildung IV.3: Nachweis der CRP-spezifischen Erkennung neu identifizierter scFv-Fragmente.
Die Kavitäten einer MTP wurden mit jeweils 100 ng Antigen beschichtet. Nach IMAC-Reinigung und Quantifizierung der löslichen scFv-Fragmente wurden Verdünnungsreihen erstellt und auf dem Antigen inkubiert. Die Absorptionen auf der Negativkontrolle BSA waren vernachlässigbar ($<0,01$) und wurden von den jeweiligen Absorptionen auf CRP subtrahiert. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte durch den monoklonalen *Maus- α -myc-IgG* (9E10) und das Antikörper-HRP-Konjugat *Ziege- α -Maus-IgG* (Fc-spezifisch).

Um zu überprüfen, ob die scFv-Fragmente in der Lage sind natives CRP zu erkennen, wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, in dem die jeweiligen scFv-Fragmente immobilisiert vorlagen. Dabei konnte für die scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 eine Bindung von nativem CRP gezeigt werden, wohingegen das scFv-Fragment IsP26-G1 natives CRP nicht binden konnte (Abbildung IV.4).

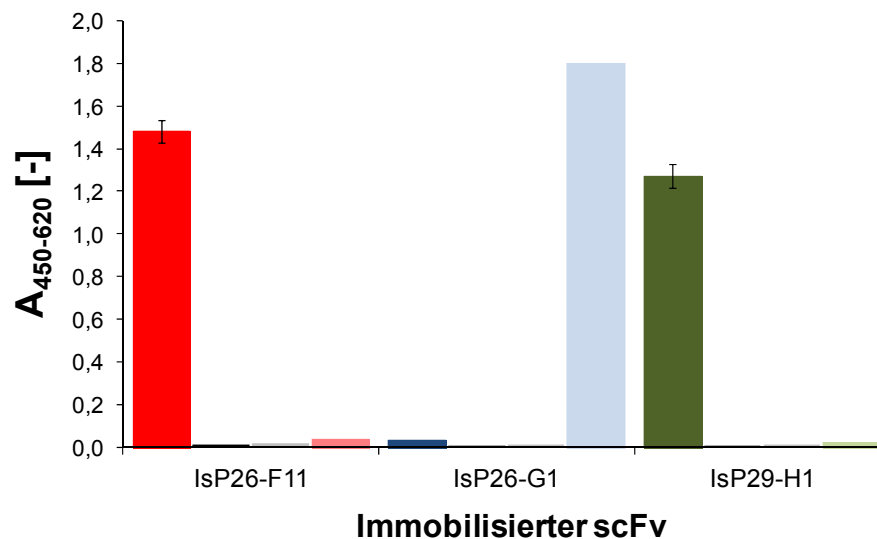


Abbildung IV.4: Nachweis der Bindung von nativem CRP mittels Sandwich-ELISA.

Jede Vertiefung wurde mit je 100 ng scFv-Fragment beschichtet. Die immobilisierten scFv-Fragmente (jeweils Triplikate) wurden anschließend mit 1 µg CRP (in PBS) inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte der Nachweis von gebundenem CRP mit Hilfe des monoklonalen *Maus-α-CRP-IgG* (4C28, C6; Diasys) und des Antikörper-HRP-Konjugats *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch) (■, ■ bzw. ■). Als Kontrollen zum Nachweis unspezifischer Bindungen des monoklonalen *Maus-α-CRP-IgG* bzw. des Nachweis-Antikörpers *Ziege-α-Maus-IgG* erfolgte eine Inkubation ohne CRP (■) bzw. zusätzlich ohne CRP und ohne *Maus-α-CRP-IgG* (■). Als Positivkontrolle erfolgte der Nachweis der CRP-Bindung *vice versa*: immobilisiertes CRP (100 ng) wurde von löslichen scFv-Fragmenten erkannt und mittels *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch)-HRP-Konjugat nachgewiesen (■, ■ bzw. ■).

IV.2.2.2 Analyse des Aggregationsverhaltens neu identifizierter scFv-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie

Um die Tendenz der neu identifizierten scFv-Fragmente zur Ausbildung von *Diabodies* oder Aggregaten zu überprüfen, wurden diese mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht. Alle scFv-Fragmente lagen überwiegend als Monomere vor. Nur das IsP26-F11-scFv-Fragment wies einen geringen Anteil an Multimeren auf (Abbildung IV.5).

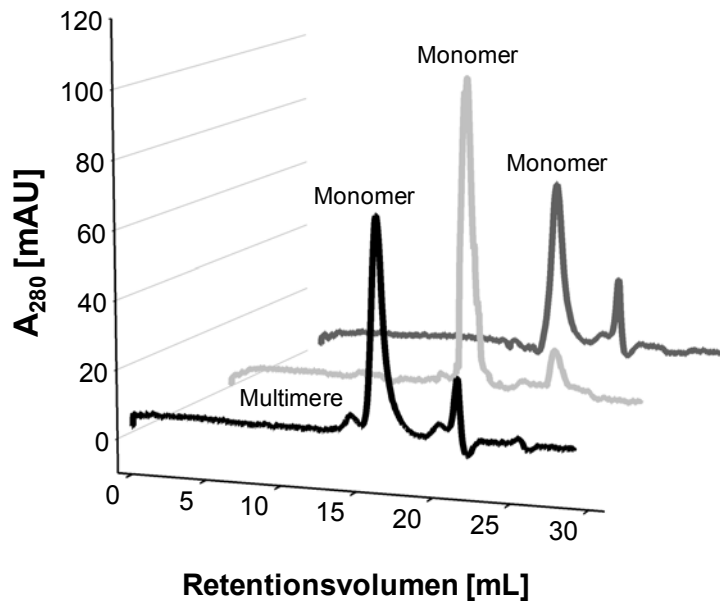


Abbildung IV.5: Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-Fragmente

Von den gereinigten scFv-Fragmenten IsP26-F11 (■), IsP26-G1 (■) und IsP29-H1 (■) wurden 200 µL (\pm 50 µg) auf eine *Superdex200-10/300-GL*-Säule geladen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min (PBS) aufgetrennt. Dargestellt sind die Absorptionssignale bei $\lambda = 280$ nm je Retentionsvolumen [mL]. scFv-Monomere: 17,5 mL; Multimeren <15 mL und sonstige Verunreinigungen ($M_r < 10.000$) ≥ 20 mL.

IV.2.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) neu identifizierter scFv-Fragmente

Nachdem bereits die Bindungseigenschaften in ELISAs und die Neigung zur Multimerbildung untersucht worden sind, wurden die Affinitäten der scFv-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *Surface Plasmon Resonance*; SPR) mit Hilfe eines *BIAcore2000*-Systems bestimmt.

Dafür wurden von den scFv-Fragmenten Verdünnungen mit definierten Konzentrationen (0 nM; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM) erstellt und die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmt. Nachfolgend sind die Sensogramme für das scFv-Fragment IsP26-G1 dargestellt (Abbildung IV.6). Für die anderen beiden scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 konnte keine Bindung an das an die Oberfläche des CM5-Chips immobilisierte CRP festgestellt werden.

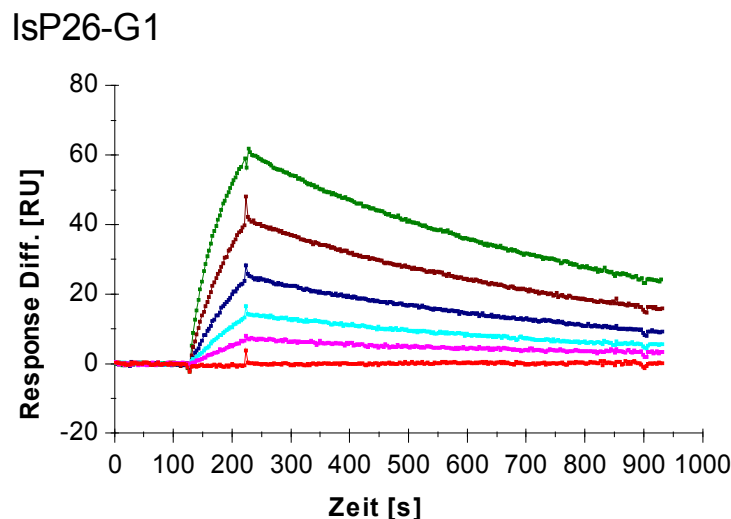


Abbildung IV.6: Affinitätsbestimmung neu identifizierter scFv-Fragmente mittels SPR.

Dargestellt sind die Sensogramme für die kinetischen Messungen der CRP-spezifischen scFv-Fragmente IsP26-G1 (A) und LA13-IE3 (B) unterschiedlicher Konzentrationen (0 nM (■); 6,25 nM (■); 12,5 nM (■); 25 nM (■); 50 nM (■); 100 nM (■)). Alle Messungen erfolgten auf CM5-Chips mit einer Flussrate von 25 μ L/min. Die Konzentration von 12,5 bzw. 50 nM scFv-Fragment wurden jeweils als Duplikate vermessen. Zur Regeneration der Messzelle wurden 25 mM HCl (pH 1,6) eingesetzt. Anhand der theoretischen Kurvenverläufe des mathematischen Fittings *drifting baseline* wurde die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Die Auswertung der Bindungskinetiken ergab für das IsP26-G1-scFv-Fragment im Vergleich zu dem bereits bekannten scFv-Fragment LA13-IE3 eine etwa dreimal so hohe Affinität zu CRP (Tabelle IV.4).

Tabelle IV.4: Bestimmung der Affinität des scFv-Fragments IsP26-G1 zu CRP.

Bindungsparameter der untersuchten scFv-Fragmente. Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a) bzw. Dissoziation (k_d), R_{\max} = maximale Response, Assoziationskonstante $K_A = k_a \times k_d^{-1}$ und Dissoziationskonstante $K_D = K_A^{-1}$, sowie der Fehler nach χ^2 und das K_D -Verhältnis.

Antikörperfragment	k_a [1 Ms^{-1}]	k_d [1 s^{-1}]	R_{\max} [RU]	K_A [1 M^{-1}]	K_D [M]	χ^2	$\frac{K_D(\text{scFv})}{K_D(\text{LA13-IE3})}$
IsP26-G1	$1,86 \times 10^5$	$1,31 \times 10^{-3}$	72,6	$1,42 \times 10^8$	$7,06 \times 10^{-9}$	0,22	3,4

IV.2.2.4 Bestimmung der Epitopkonformation der neu identifizierten scFv-Fragmente

Um die Konformation der Epitope der in dieser Arbeit neu identifizierten scFv-Fragmente zu bestimmen, wurde CRP mit Hilfe einer reduzierenden (A) bzw. nicht reduzierenden (B) SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die CRP-Bindung der einzelnen scFv-Fragmente wurde anschließend mittels Immunostain nachgewiesen.

Für die scFv-Fragmente LA13-IIE3 und IsP26-G1 konnte die Erkennung linearer Epitope gezeigt werden, wohingegen für die scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 nur unter nicht reduzierenden Bedingungen eine sehr schwache Bindung an das CRP nachgewiesen wurde (Abbildung IV.7). Die Erkennung konformationeller Epitope bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche. In denen konnte sowohl an MTP- (Abbildung IV.3) als auch an CM5-Chip-immobilisiertes und dadurch partiell denaturiertes CRP (Abbildung IV.6) nicht durch die scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 gebunden werden.

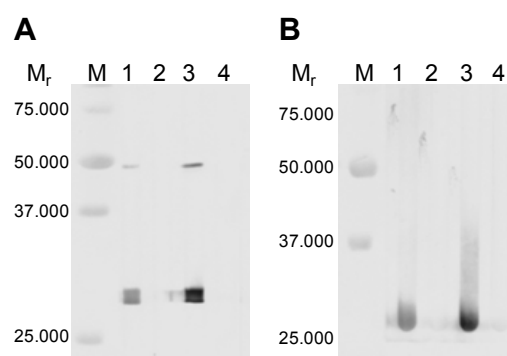


Abbildung IV.7: Nachweis der Erkennung konformationeller Epitope neu isolierter scFv-Fragmente.

Jeweils 5 µg CRP wurde auf PAA-Gele aufgetragen unter reduzierenden (A) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen, d. h. kein Aufkochen nach Zugabe von Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol (B) aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Inkubation mit jeweils 2 µg der einzelnen scFv-Fragmente für 1 h bei RT erfolgte der Nachweis mittels Maus-α-myc-IgG (9E10) und Ziege-α-Maus-IgG (Fc-spezifisch)-AP-Konjugat. Als Marker diente der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad, München).

Bahn 1: LA13-IIE3
Bahn 2: IsP26-F11

Bahn 3: IsP26-G1
Bahn 4: IsP29-H1

Mit Hilfe dieser Strategie konnten mindestens drei neuartige monoklonale CRP-spezifische scFv-Fragmente identifiziert und charakterisiert werden. Dabei konnten zwei scFv-Fragmente (IsP26-F11 und IsP29-H1) isoliert werden, die in der Lage sind, ausschließlich konformationelle Epitope zu erkennen. Diese scFv-Fragmente müssten weiter biochemisch analysiert werden (z. B. unter modifizierten Bedingungen mit SPR oder ELISA), was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte. Das IsP26-G1-scFv-Fragment wies eine erhöhte Affinität zu CRP auf (Tabelle IV.4). Er stellt somit eine Alternative zum bereits vorhandenen LA13-IIE3-scFv-Fragment dar, da mit ihm sehr geringe CRP-Konzentrationen in der QCM-Messung nachgewiesen werden könnten.

IV.3 MUTAGENISIERTE ANTIKÖRPERGENBIBLIOTHEKEN

Die bereits vorhandenen CRP-spezifischen Antikörperfragmente LA13-IIE3 und TOB5-D4 wurden genetisch modifiziert, um Eigenschaften wie Affinität oder Stabilität (Temperatur, pH) zu verändern. Zur Erzeugung von Varianten dieser scFv-Fragmente wurden zufällige Mutationen in die korrespondierenden Gene eingebracht. Die so erzeugten mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken wurden validiert und anschließend für verschiedene Selektionsprozesse eingesetzt.

IV.3.1 Erstellung der mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ mittels *Nested-error-prone-PCR*

Die beiden Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ basieren auf dem Phagemid-Vektor pHAL14 (Hust *et al.*, 2007a). In die korrespondierenden Genen der CRP-spezifischen Antikörperfragmente LA13-IIE3-scFv, nachfolgend als Antikörpergenbibliothek „A“ bezeichnet, und TOB5-D4-scFv, nachfolgend als Antikörpergenbibliothek „B“ bezeichnet, wurden mittels *Nested-error-prone-PCR* zufällig Punktmutationen eingeführt.

Hierfür wurden die entsprechenden scFv-Gene aus den vorhandenen Plasmiden pIT2-LA13-IIE3 bzw. pHAL14-TOB5-D4 mit Hilfe eines Zufalls-Mutagenese-PCR-Kits (*GeneMorph® II*, Agilent Technologies) mit spezifischen Primern (MH_LacZ_Pro_f + LA-pIT2-gIII-r1 bzw. HT-gIII-Beginn1-rev | MKpelB_f + MKmyc_r | IIB6-Aff2-fwd + IIB6-Aff2-rev) amplifiziert. Dabei kamen insgesamt drei verschiedene Primerpaare zum Einsatz, die sequentiell verwendet wurden. Nach jeder einzelnen PCR-Runde wurde die DNA gereinigt, auf eine Konzentration von 1 ng/μL verdünnt und als Template für weitere *Error-prone-PCRs* eingesetzt. Um die Mutationsraten weiter zu erhöhen, wurden insgesamt sechs („A“) bzw. fünf („B“) PCR-Runden nacheinander durchgeführt (Abbildung IV.8). Nach der jeweils letzten *Error-prone-PCR* wurde abschließend eine letzte PCR zur Steigerung der Ausbeute für nachfolgende Klonierungsschritte durchgeführt. Dabei wurde die *Phusion®*-DNA-Polymerase und die Primerpaare (TS_PelB_pIT_f / TS_PelB_pHAL14_f + TS_6xHis_r) verwendet.

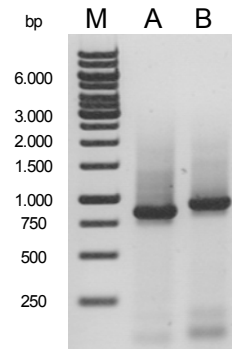


Abbildung IV.8: Antikörpergenbibliotheken „A“ und „B“ nach *Error-prone*-PCR.

Je 5 µL wurden nach der sechsten („A“) bzw. fünften („B“) PCR-Runde im Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Vollständige scFv-Genfragmente resultierten nach der PCR in DNA-Banden bei 817 bp („A“) bzw. 890 bp („B“).

Die so erhaltene DNA der mutierten scFv-Gene wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI in den Phagemid-Vektor pHAL14 kloniert (Abbildung IV.9). Im Anschluss wurden elektrokompente *E. coli*-XL1-Blue-MRF'-Zellen (Stratagene, Nümbrecht) mit dem Ligationsansatz via Elektroporation transformiert. Die Transformationseffizienz betrug dabei $1,2 \times 10^7$ cfu („A“) bzw. $2,5 \times 10^7$ cfu („B“). Dies entspricht den maximalen theoretischen Komplexitäten der erzeugten Antikörpergenbibliotheken.

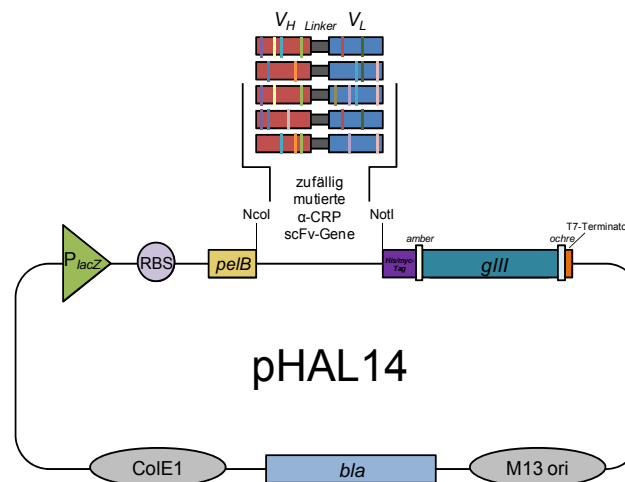


Abbildung IV.9: Schematische Darstellung der Klonierung von Antikörpergenbibliotheken.

Die mittels *Error-prone*-PCR zufällig mutagenisierten Gene, die für scFv-Fragmente LA13-II-E3 und TOB5-D4 kodieren, wurden mit den Restriktionsendonuklease NcoI und NotI geschnitten und in den Phagemid-Vektor pHAL14 ligiert.

Die Antikörpergenbibliotheken wurden mit Hilfe des Helferphagens M13K07 verpackt. Nach Amplifikation und anschließender Reinigung der Antikörperphagen wurde für die Antikörperphagen-Bibliotheken ein Phagen-Titer von $3,2 \times 10^{14}$ („A“) bzw. $3,4 \times 10^{14}$ pfu/mL („B“) ermittelt. Um die Qualität der erzeugten Antikörperphagen-Bibliotheken abschätzen zu können, wurde eine Kolonie-PCR mit ca. 20 Einzelklonen durchgeführt. Dabei zeigten 56 % („A“) bzw. 39 % („B“) der untersuchten Einzelklone eine DNA-Bande bei ca. 1,2 kB, was auf ein

vollständiges Antikörperfragment hinwies. Religierte Vektoren, d. h. Vektoren ohne scFv-Insert, wiesen hingegen eine Bande im Größenbereich bei ca. 0,5 kB auf (Abbildung IV.10).

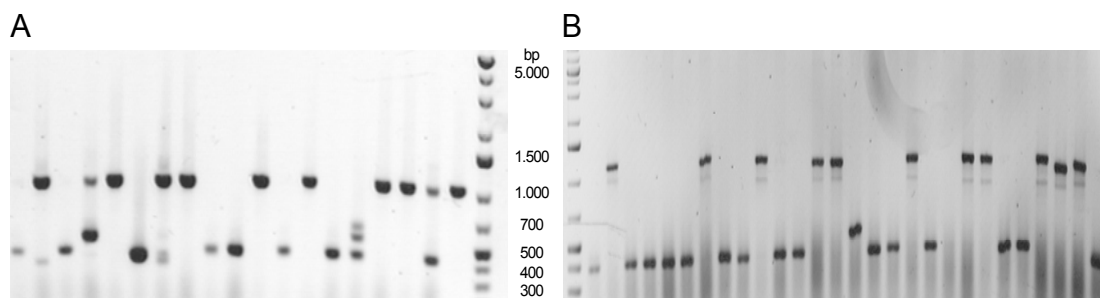


Abbildung IV.10: Qualität der Verpackung mutagenisierter Antikörperbibliotheken.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Kolonie-PCR von Einzelklonen der mittels Helferphagen M13K07 verpackten Antikörperbibliotheken „A“ (A) und „B“ (B). Dabei zeigten ca. 56 % (A) bzw. 39 % (B) ein vollständiges scFv-Fragment.

Zur Abschätzung der Mutationsraten der einzelnen Antikörperbibliotheken wurde eine Sequenzanalyse von jeweils zehn Klonen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Durchschnitt ca. 20 Punktmutationen über das gesamte scFv-Gen hinweg eingefügt wurden, wobei jede zweite Punktmutation zu einem Aminosäure (AS)-Austausch führte. Allerdings zeigten neun der zehn untersuchten Klone kein vollständiges, funktionsfähiges scFv-Fragment (Tabelle IV.5).

Tabelle IV.5: Übersicht über die mutagenisierten Antikörperbibliotheken.
Zusammenfassung der Ergebnisse der initialen Charakterisierung.
*Anteil von Klonen mit vollständigem scFv-Fragment.

Bibliothek	Error-prone-PCR-Runden	Theoretische Komplexität	Qualität* nach Verpackung	Ø Mutationsrate (PM / scFv-Gen)	AS-Austausche
A	6	$1,2 \times 10^7$	56 %	19	9
B	5	$2,5 \times 10^7$	39 %	21	9

IV.3.2 Evaluierung der mutagenisierten Antikörperbibliotheken „A“ und „B“

Zur weiteren biochemischen Evaluierung wurden die Qualität der Verpackung und die Funktionalität der Antikörperphagen mittels Phagen-Titrations-ELISA überprüft. Die mit dem Antigen (CRP bzw. BSA) beschichteten Oberflächen der Kavitäten einer MTP wurden mit unterschiedlichen Phagenpartikel-Konzentrationen (jeweils Triplikate) inkubiert. Schwach bindende Antikörperphagen wurden durch Waschen der MTP im ELISA-Washer entfernt.

Für beide Antikörperphagen-Bibliotheken konnte mittels *Maus-α-M13-HRP*-Konjugat eine spezifische Bindung an CRP nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Antikörperphagen von „A“ eine deutlich höhere Bindung an CRP als die von „B“, was zum einen an der besseren Verpackungsqualität (Abbildung IV.10) als auch an der höheren Affinität des scFv-Fragments LA13-IIE3 gegenüber der des TOB5-D4-scFv-Fragments liegen könnte (Abbildung IV.11).

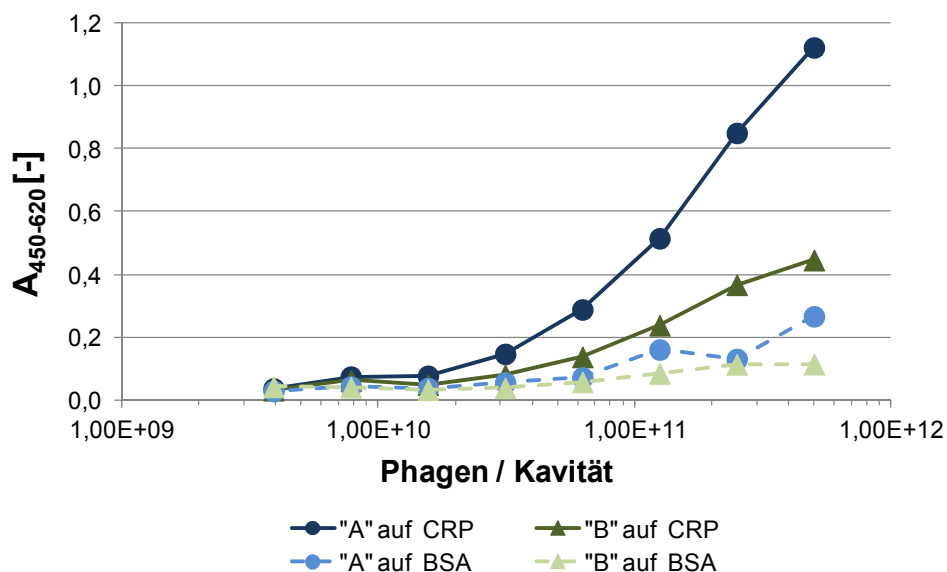


Abbildung IV.11: Nachweis der spezifischen Bindung der Antikörperphagen an CRP.

An die Oberflächen der Kavitäten einer MTP wurde CRP bzw. BSA (Negativkontrolle) immobilisiert. Nach der Inkubation mit Antikörperphagen ($0,5 \times 10^{11}$ – $3,9 \times 10^9$ Phagen, jeweils Triplikate) wurde gewaschen. Der Nachweis erfolgte mittels *Maus- α -M13-HRP-Konjugat*.

IV.3.3 Selektion von CRP-spezifischen Antikörperphagen unter Verwendung mutagenisierter Antikörperphagen-Bibliotheken

Die beiden erstellten Antikörperphagen-Bibliotheken „A“ und „B“ wurden zur Selektion von scFv-Fragmenten mit veränderten Eigenschaften wie z. B. Affinität oder Temperatur-, Salz- und pH-Stabilität verwendet. Dabei erfolgte das *Screening* der Antikörperphagen-Bibliothek „B“ im Rahmen einer betreuten Masterarbeit (Popp, 2011). Insgesamt wurden drei Selektionsrunden durchgeführt. Die Amplifikation der Antikörperphagen erfolgte in Schüttelkolben („A“) bzw. in MTP mittels *High Throughput Screening* (HTS)-Protokoll („B“). Die Phagentiter der eluierten Phagen variierten in jeder Selektionsrunde von $2,2 \times 10^7$ cfu/mL bis $2,2 \times 10^8$ cfu/mL.

Zur Identifizierung monoklonaler Binder gegen CRP wurden aus der dritten Selektionsrunde jeweils 184 Einzelkolonien ausgewählt und lösliche Antikörper-Fragmente im MTP-Maßstab produziert. Die Produktionsüberstände wurden in einem monoklonalen Antigen-ELISA überprüft. Für einen Vergleich mit dem jeweiligen Ausgangsklon LA13-IIE3 („A“) bzw. TOB5-D4 („B“) wurden diese als Positivkontrolle mit analysiert. Als Kontrolle zum Nachweis einer unspezifischen Bindung der Antikörper-Fragmente wurde BSA eingesetzt.

Für die Antikörperphagen-Bibliothek „A“ konnten mehr als 40 CRP-spezifische Binder mit einem signifikant höheren ELISA-Signal ($A_{450-620} > 0,6$) als das Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3 identifiziert werden. Von diesen wurden 30 Klone für eine weitere Charakterisierung ausgewählt (Abbildung IV.12).

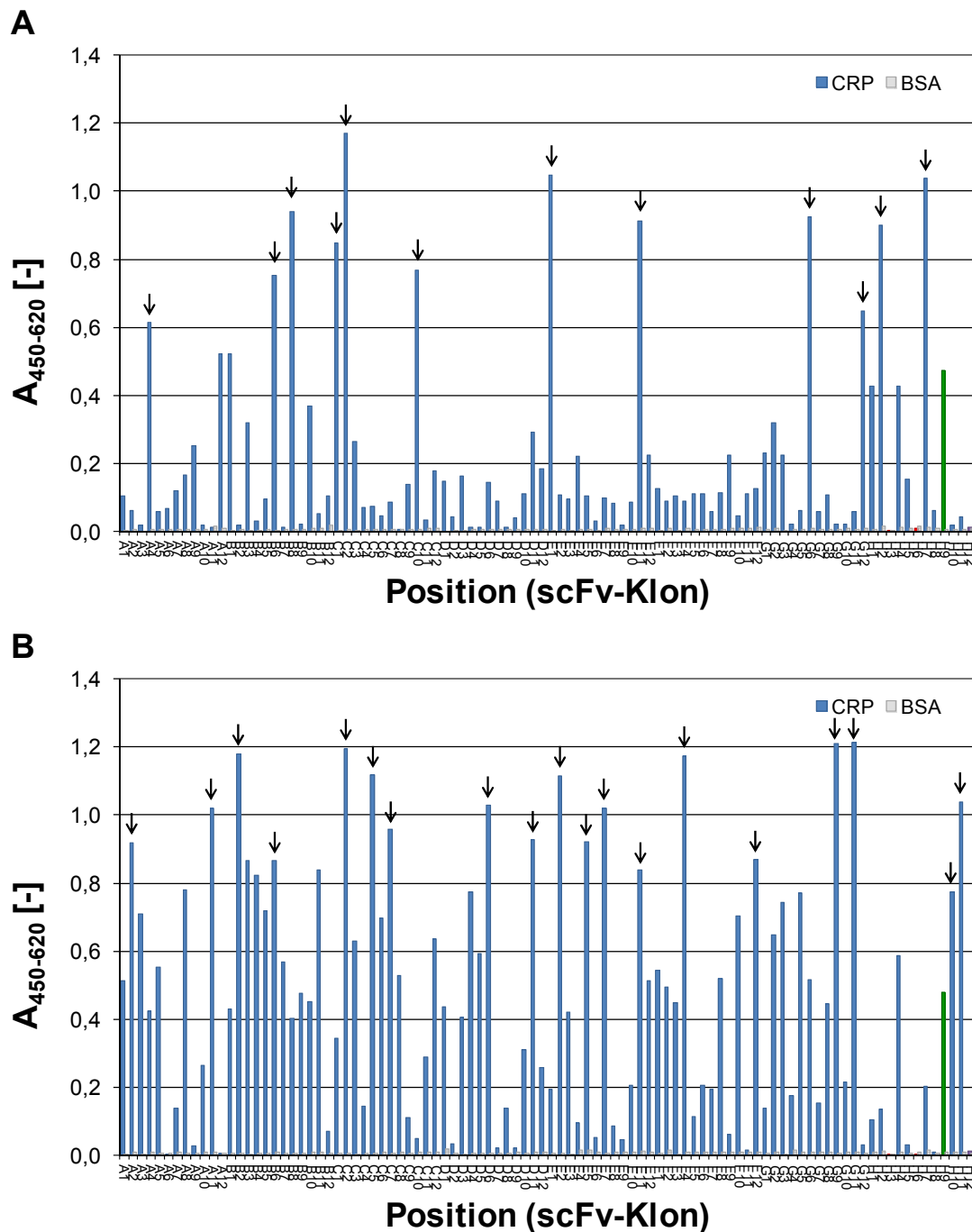


Abbildung IV.12: Identifizierung CRP-spezifischer monoklonaler scFv-Fragmente.

Jede Kavität wurde vor der Inkubation mit 100 µL Produktionsüberstand mit 100 ng CRP (blaue Balken) bzw. BSA (graue Balken) beschichtet. Als Positivkontrolle wurden der Ausgangsklon LA13-IIE3 (grün) eingesetzt. H3 und H6 enthielten nicht inokuliertes Medium und wurden als Kontrolle für Kreuzkontaminationen eingesetzt (rote Balken). Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte mittels monoklonalem *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und polyklonalem Antikörper-HRP-Konjugat *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch). Die im Weiteren analysierten Einzelklone sind mit schwarzen Pfeilen markiert. (A) Produktionsplatte 1, (B) Produktionsplatte 2.

Die ausgewählten Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf vollständige scFv-Genfragmente überprüft (Daten nicht gezeigt), die erhaltenen DNA-Fragmente gereinigt und sequenziert. Mit Hilfe der Datenbank *VBASE2* erfolgte eine bioinformatische Analyse der erhaltenen Sequenzinformationen. Dabei wurden die Gensequenzen mit den Originalsequenzen der

jeweiligen Ausgangsklone LA13-IIE3 und TOB5-D4 verglichen. Nukleotid- und AS-Alignments ergaben, dass im Falle von „A“ 13 sequenzverschiedene Klone angereichert wurden. Bei „B“ wiesen alle zehn untersuchten Klone eine unterschiedliche AS-Sequenz auf. Durchschnittlich traten 12,6 („A“) bzw. 13,6 („B“) Punktmutationen auf, die zu jeweils 4,5 AS-Austauschen im gesamten scFv-Fragment führten. Dabei waren 1,9 („A“) bzw. 1,7 („B“) AS-Austausche in den CDRs lokalisiert (Tabelle IV.6). Alle Unikate wurden für weitere biochemische Analysen eingesetzt.

Tabelle IV.6: Übersicht über CRP-spezifische monoklonale Binder.
Zusammenfassung der Ergebnisse der bioinformatischen Analyse.

Bibliothek	CRP-spezifische Binder	Sequenz-verschiedene Klone	Ø Mutationsrate (PM / scFv-Gen)	Ø AS-Austausche	Ø AS-Austausche in CDRs
A	30	13	12,6	4,5	1,9
B	10	10	13,6	4,5	1,7

IV.3.4 Proteinbiochemische Analysen mutagenisierter scFv-Fragmente

Nach der Produktion im MTP-Maßstab wurde die spezifische Antigenbindung aller scFv-Fragmente im Titrations-ELISA verifiziert und bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden fünf Klone: DF39-A4, DF39-E1, DF39-E11, DF40-B6 und DF40-G11 ausgewählt und gemeinsam mit dem Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3 nachfolgend weiter biochemisch charakterisiert.

Zur Produktion der scFv-Fragmente im LEX®-Bioreaktor wurden die korrespondierenden scFv-Gene in die Expressionsvektoren pOPE101-XP (DF40-B6 und LA13-IIE3) bzw. pOPE107-XP (alle übrigen) subkloniert.

Die einzelnen *E.-coli*-Kulturen wurden angezogen und die rekombinante Genexpression mit IPTG induziert. Nach Inkubation bei 18 °C ü. N. wurden die Zellen geerntet und die Überstände verworfen. Die periplasmatischen (PE-) und osmotischen Schock (OS)-Fraktionen wurden vereinigt und mittels IMAC gereinigt. Für alle Klone konnten scFv-Fragmente mit einer relativen Molekülmasse von $M_r \approx 30.000$ isoliert werden (Abbildung IV.13).

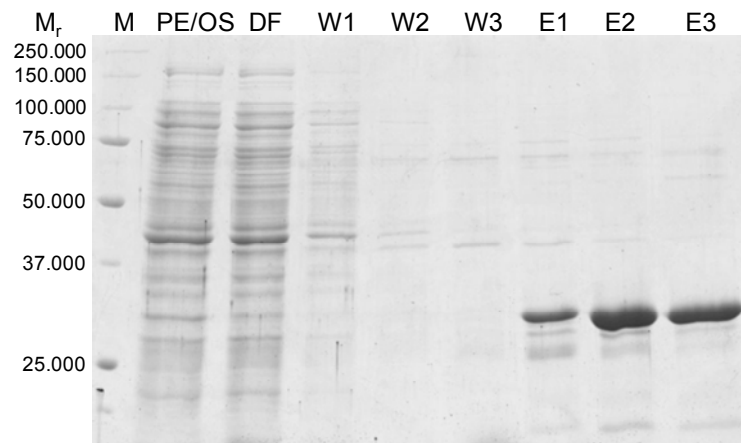


Abbildung IV.13: IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten nach der Produktion im LEX®-Bioreaktor.

Stellvertretend für alle Varianten sind die Ergebnisse der Reinigung des DF40-DF40-G11-scFv-Fragments dargestellt. Jeweils 10 µL eines Reinigungsschrittes der unterschiedlichen Fraktionen wurden mittels einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt (PE = Periplasmatische Fraktion, OS = Osmotische Schockfraktion; DF = Durchfluss; W1-3 = Waschfraktionen; E1-3 = Elutionsfraktionen). Als Proteingrößenstandard wurde der *Precision Plus Protein Unstained Standard* (BioRad, München) verwendet. Die Färbung der Proteine erfolgte mit *Coomassie® Brilliant Blue R250*.

Aufgrund der großen Bedeutung für spätere Analysen (BIAcore, etc.) wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Elutionsfraktionen sowohl photometrisch, mittels ELISA und ggf. zusätzlich densitometrisch bestimmt (Tabelle IV.7).

Tabelle IV.7: Proteinkonzentrationen der gereinigten scFv-Fragmente.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dabei photometrisch, via ELISA und zusätzlich densitometrisch. Dargestellt sind die Mittelwerte der unterschiedlichen Bestimmungen. Anhand der Konzentration der jeweiligen Elutionsfraktion konnte über das Elutionsvolumen auf die Proteinausbeute pro Liter Kulturvolumen geschlossen werden.

scFv-Fragment	Konzentration [mg/mL]	Elutionsvolumen [mL]	Ausbeute scFv/Kulturvolumen [mg/L]
LA13-IIIE3	0,75	4,0	1,7
DF39-A4	0,85	1,5	0,7
DF39-E1	0,56	1,5	0,5
DF39-E11	0,75	1,5	0,6
DF40-B6	0,43	4,0	1,0
DF40-G11	0,91	1,5	0,8

IV.3.5 Titrations-ELISA mit gereinigten scFv-Fragmenten

Mit Hilfe eines Titrations-ELISAs, bei dem eine Verdünnungsreihe mit definierten scFv-Konzentrationen eingesetzt wurde, konnte eine erste Abschätzung der Bindungseigenschaften der gereinigten, affinitätsgereiften scFv-Fragmente angestellt werden. Die Bindungseigenschaften zeichnen sich hauptsächlich durch die Affinität zum Antigen, aber auch durch Aviditätseffekte der ggf. multimerisierten scFv-Fragmente aus. Es konnte für alle ausgewählten mutagenisierten Antikörperfragmente eine CRP-spezifische Bindung nachgewiesen werden (Abbildung IV.14). Dabei wurde bei den mutagenisierten Antikörperfragmenten DF39-A4, DF39-E1 und, DF40-G11 die halbmaximale Absorption bei einer um den Faktor 2 – 3 geringeren scFv-Konzentration erreicht als bei dem Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3. Dies deutet auf eine erhöhte Affinität hin. Die übrigen scFv-Fragmente schienen vergleichbare bzw. schlechtere Affinitäten zu CRP aufzuweisen.

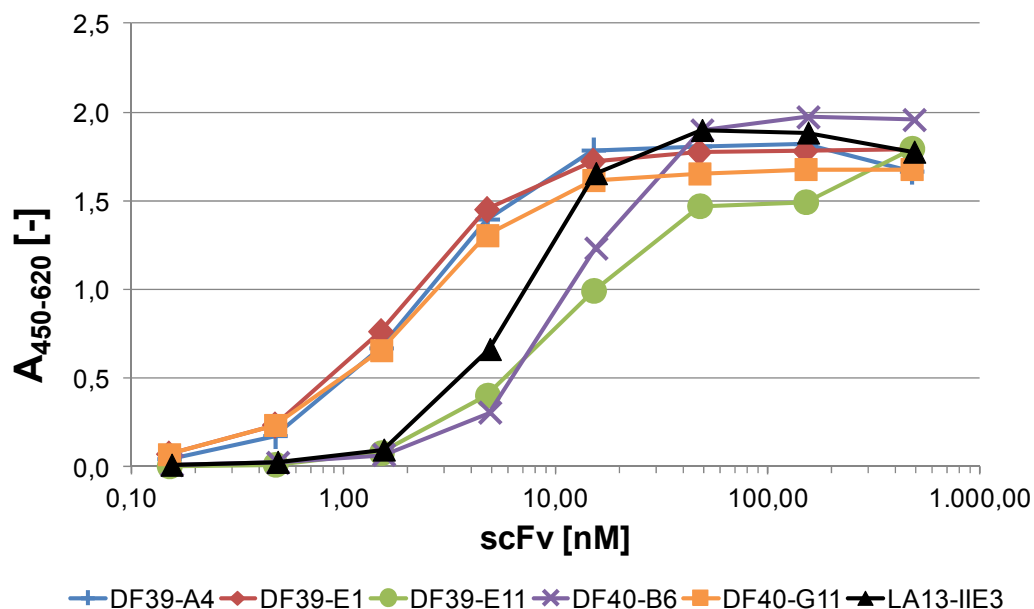


Abbildung IV.14: Nachweis der spezifischen CRP-Bindung mutagenisierter LA13-IIE3-Derivate.

Die Kavitäten einer MTP wurden mit jeweils 100 ng Antigen beschichtet. Nach IMAC-Reinigung und Quantifizierung der löslichen scFv-Fragmente wurden Verdünnungsreihen erstellt und die entsprechenden Lösungen auf dem Antigen inkubiert. Die Absorptionen auf der Negativkontrolle BSA waren vernachlässigbar ($A_{450-620} < 0,02$) und wurden von den jeweiligen Absorptionen auf CRP subtrahiert. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte durch den monoklonalen *Maus- α -myc-IgG* (9E10) und das Antikörper-HRP-Konjugat *Ziege- α -Maus-IgG* (Fc-spezifisch).

IV.3.6 Bestimmung der Epitopkonformation mutagenisierter scFv-Fragmente

Da das LA13-IIE3-scFv-Fragment ein lineares Epitop erkennt, wohingegen der TOB5-D4-scFv ausschließlich ein konformationelles binden kann (Al-Halabi, 2008), sollte nun als nächstes untersucht werden, ob die mutagenisierten scFv-Fragmente das gleiche Bindungsverhalten wie die korrespondierenden Ausgangs- Fragmente zeigten.

Dabei wurde für alle LA13-IIE3-Derivate die Erkennung linearer Epitope nachgewiesen, wobei die vorausgegangene Behandlung des CRPs keinen Einfluss auf deren Erkennung hat (Abbildung IV.15). Das native CRP-Pentamer zerfällt demnach bereits durch das Auftrennen im PAA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen in Monomere. Im Gegensatz dazu zeigten sämtliche TOB5-D4-Derivate nur unter nicht reduzierenden Bedingungen eine sehr schwache Bindung an das CRP, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen einige wenige konformationelle Epitope erhalten blieben.

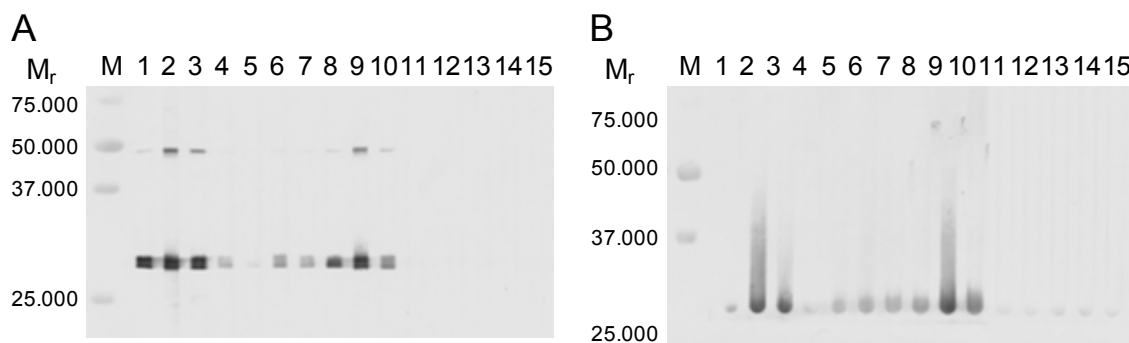


Abbildung IV.15: Nachweis zur Erkennung konformationeller Epitope mutagenisierter scFv-Fragmente.

Jeweils 5 µg CRP wurden auf PAA-Gele unter reduzierenden (A) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen, d.h. kein Aufkochen nach Zugabe von Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol, (B) aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Inkubation mit jeweils 2 µg der einzelnen scFv-Fragmente für 1 h bei RT erfolgte der Nachweis mittels *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und *Ziege-α-Maus-IgG* (Fc-spezifisch)-AP-Konjugat. Als Marker diente der *Precision Plus Protein™ Dual Color Standard* (Biorad, München).

Bahn 1: DF39-A4
Bahn 2: DF39-C2
Bahn 3: DF39-E1
Bahn 4: DF39-E11
Bahn 5: DF40-B6
Bahn 6: DF40-D6
Bahn 7: DF40-D11
Bahn 8: DF40-E7

Bahn 9: DF40-G11
Bahn 10: LA13-IIE3
Bahn 11: IsP8-IC8
Bahn 12: IsP8-IG8
Bahn 13: IsP8-IC11
Bahn 14: IsP8-IIE7
Bahn 15: TOB5-D4

IV.3.7 Stabilitätsanalyse mutagenisierter scFv-Fragmente

Um die Stabilität der gereinigten scFv-Fragmente zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche ELISA-Stabilitätstests durchgeführt. Zum einen wurde ein Langzeit-Stabilitätstest mit einer Inkubationszeit von 0 – 14 Tagen bei 37 °C durchgeführt (Abbildung IV.16 A), zum anderen ein Hitze-Stabilitätstest mit einer Inkubation von 30 min bei 45 – 70 °C (Abbildung IV.16 B). Dafür wurden Aliquots (je 1 µg/mL) der zu untersuchenden scFv-Fragmente in PBS erstellt und entsprechend behandelt. Der Nachweis der verbliebenen Aktivität der scFv-Fragmente wurde mittels ELISA auf CRP (durchgezogene Linie) und auf BSA (gestrichelte Linie) zur Überprüfung unspezifischer Bindung überprüft.

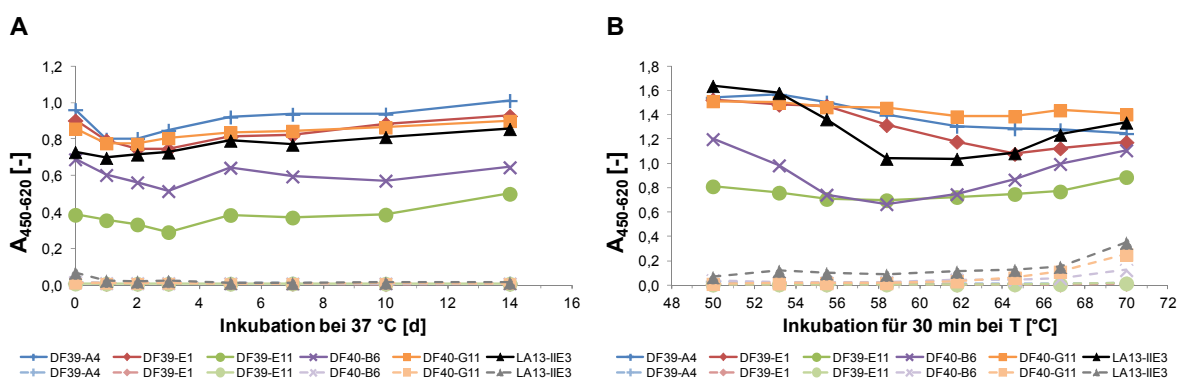


Abbildung IV.16: Stabilitätstests gereinigter LA13-IIE3-Derivate.

Von jedem scFv-Fragment wurden Aliquots (je 1 µg/mL) in PBS erstellt und wie nachfolgend beschrieben behandelt. **(A)** Langzeit-Stabilitätstest: Inkubation für 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14 Tage bei 37 °C; **(B)** Hitze-Stabilitätstest: Inkubation im Thermocycler für 30 min bei 45 - 70 °C. Im Anschluss an die Inkubationen wurden die Aktivitäten der scFv-Fragmente mittels ELISA auf CRP (durchgezogene Linien) und BSA (gestrichelte Linien) überprüft. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte durch den monoklonalen *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und das Antikörper-HRP-Konjugat *Ziege-α-Maus-IgG* (Fc-spezifisch).

Bei dem Langzeitstabilitätstest zeigte sich bei allen scFv-Fragmenten eine Reduzierung der Aktivität nach den ersten 24 h bei 37 °C. Bei den mutagenisierten scFv-Fragmenten ist der Aktivitätsverlust gleich oder höher als beim Ausgangs-scFv-Fragment selbst (Abbildung IV.16 A). Danach bleibt die Aktivität im Wesentlichen konstant und ändert sich nur gering. Auch konnte keine signifikante Bindung an BSA (gestrichelte Linien) festgestellt werden.

Bei dem Hitze-Stabilitätstest zeigten zwei der LA13-IIE3-Derivate sowie das Ausgangs-scFv-Fragment einen deutlichen Aktivitätsverlust (bis zu 40 %) ab einer Temperatur von 53 °C. Bei höheren Temperaturen nahm die Absorption aufgrund unspezifischer Bindung wieder zu. Die übrigen drei scFv-Fragmente (DF39-A4, DF39-E11 und DF40-G11) zeichneten sich durch eine konstante Aktivität über das gesamte Temperaturprofil aus (Abbildung IV.16 B). Lediglich bei höheren Temperaturen ist vor allem beim LA13-IIE3-scFv-Fragment aufgrund von Denaturierung ein Anstieg bei der unspezifischen Bindung an BSA zu erkennen.

IV.3.8 Analyse des Aggregationsverhaltens mutagenisierter scFv-Fragmente mittels SEC

Um die Tendenz der CRP-spezifischen scFv-Fragmente zur Ausbildung von *Diabodies* oder Aggregaten zu überprüfen, wurden diese mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht.

Die scFv-Fragmente DF39-E1, DF39-E11 und DF40-B6 wiesen im Vergleich zum LA13-IIE3 eine leicht verringerte Tendenz zur Dimerisierung auf, wohingegen die Kandidaten DF39-A4 und DF40-G11 einen deutlich erhöhten Dimerisierungsgrad aufzeigten (Abbildung IV.17).

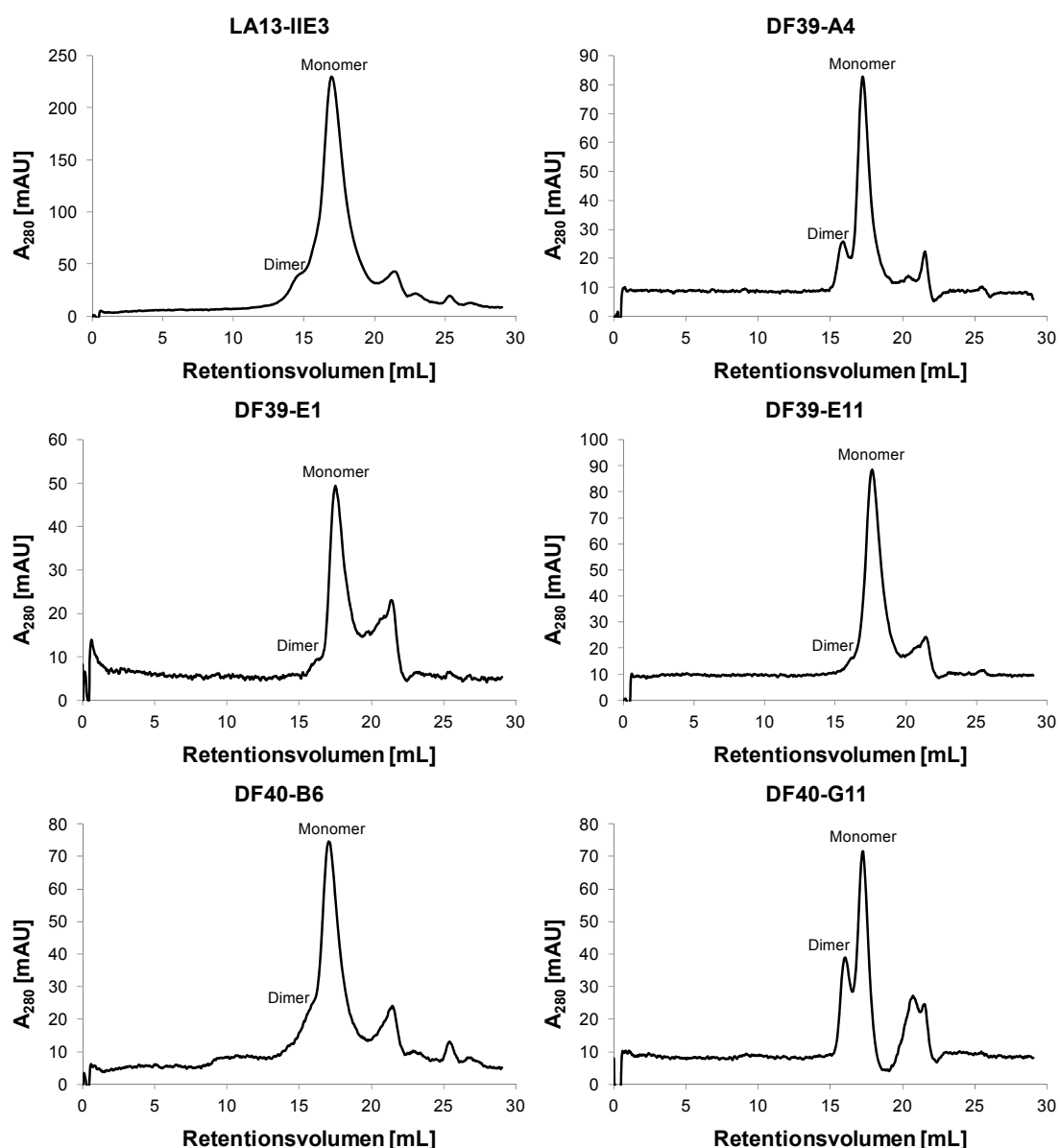


Abbildung IV.17: Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-Fragmente.

Von den gereinigten scFv-Fragmenten wurden $\approx 150 \mu\text{g}$ auf eine *Superdex200-10/300-GI*-Säule geladen und bei einer Fließgeschwindigkeit von $0,5 \text{ mL/min}$ (PBS) aufgetrennt. Dargestellt sind die Absorptionssignale bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ je Retentionsvolumen [mL]. scFv-Monomere: $17,5 \text{ mL}$; Multimerie $< 15 \text{ mL}$; sonstige Verunreinigungen ($M_r < 10.000$) $\geq 20 \text{ mL}$.

IV.3.9 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) CRP-spezifischer scFv-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die Affinitäten der generierten CRP-spezifischen scFv-Fragmente zu CRP wurden mittels SPR mit Hilfe eines *BIAcore2000*-Systems bestimmt. Dafür wurden von den scFv-Fragmenten Verdünnungen mit definierten Konzentrationen (0 nM; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM) erstellt und die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmt. Nachfolgend sind die Sensogramme der verschiedenen scFv-Fragments dargestellt (Abbildung IV.18).

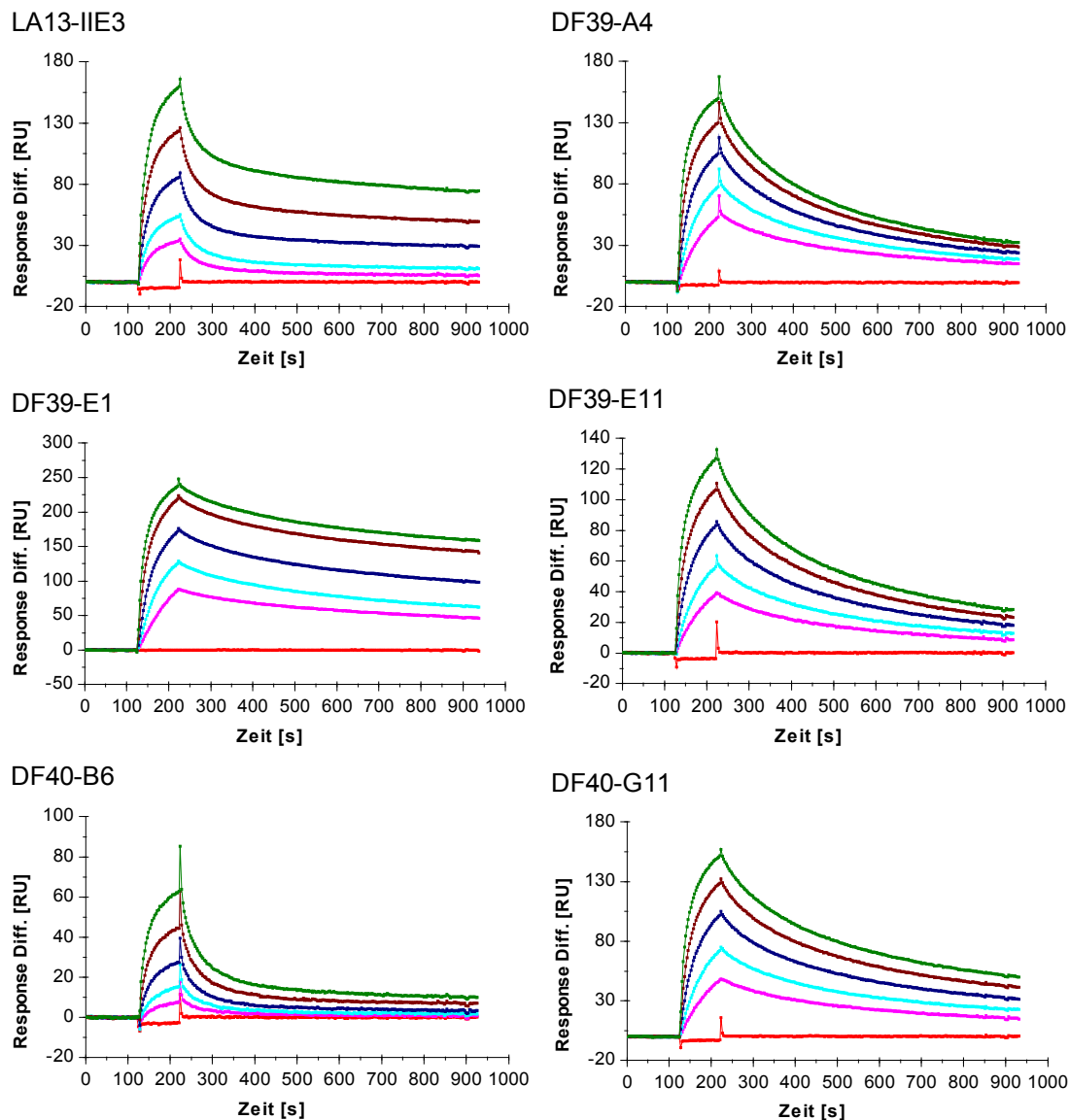


Abbildung IV.18: Affinitätsbestimmung mutagenisierter scFv-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR).

Dargestellt sind die Sensogramme der kinetischen Messungen von CRP-spezifischen scFv-Fragmenten unterschiedlicher Konzentrationen (0 nM (■); 6,25 nM (■); 12,5 nM (■); 25 nM (■); 50 nM (■); 100 nM (■)). Alle Messungen erfolgten auf CM5-Chips mit einer Flussrate von 25 μ L/min. Zur Regeneration der Messzelle wurden 25 mM HCl (pH 1,6) eingesetzt. Anhand der theoretischen Kurvenverläufe des mathematischen *drifting baseline fittings* (nicht gezeigt) wurde die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Mit Ausnahme des DF40-B6-scFv-Fragments zeigten alle Kandidaten eine deutlich langsamere Dissoziation im Vergleich zum Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3, was sich auch in den z. T. deutlich geringeren K_D -Werten (bis zu Faktor 10) widerspiegelt (Tabelle IV.8).

Tabelle IV.8: Bestimmung der Affinität der scFv-Fragmente zu CRP.

Bindungsparameter der untersuchten scFv-Fragmente. Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a) bzw. Dissoziation (k_d), R_{\max} = maximale Response, Assoziationskonstante $K_A = k_a \times k_d^{-1}$ und Dissoziationskonstante $K_D = K_A^{-1}$, sowie der Fehler nach χ^2 und das K_D -Verhältnis von Wildtyp zur Mutante.

Antikörperfragment	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	R_{\max} [RU]	K_A [M^{-1}]	K_D [M]	χ^2	$\frac{K_D(\text{Wildtyp})}{K_D(\text{Mutante})}$
LA13-IIE3	$5,95 \times 10^5$	$14,4 \times 10^{-3}$	142	$4,14 \times 10^7$	$2,42 \times 10^{-8}$	3,3	1,0
DF39-A4	$7,96 \times 10^5$	$3,45 \times 10^{-3}$	135	$2,31 \times 10^8$	$4,33 \times 10^{-9}$	5,9	5,6
DF39-E1	$7,32 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-3}$	216	$3,77 \times 10^8$	$2,65 \times 10^{-9}$	7,8	9,1
DF39-E11	$6,19 \times 10^5$	$3,36 \times 10^{-3}$	116	$1,84 \times 10^8$	$5,43 \times 10^{-9}$	3,1	4,5
DF40-B6	$2,89 \times 10^5$	$10,1 \times 10^{-3}$	66	$2,87 \times 10^8$	$3,48 \times 10^{-8}$	1,1	0,7
DF40-G11	$6,39 \times 10^5$	$2,84 \times 10^{-3}$	137	$2,25 \times 10^8$	$4,44 \times 10^{-9}$	4,8	5,5

IV.3.10 Konvertierung mutagenisierter scFv-Fragmente in bivalente humane Antikörperfragmente

IV.3.10.1 Produktion und Reinigung von scFv-hlgG1Fc-Antikörpern

Um Antikörperfragmente mit erhöhter Stabilität und gesteigerter apparenten Affinität zu testen, wurden bivalente scFv-hlgG1Fc-Fusionen erzeugt und in einem eukaryotischen Expressionssystem produziert. Hierfür wurden die entsprechenden scFv-Gene in die eukaryotischen Expressionsvektoren pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP subkloniert, die Vektoren in eukaryotische HEK293-6E-Zellen (Durocher *et al.*, 2002) mittels Pei-Transfektion eingebracht und die entsprechenden neuen scFv-Fc-Fusionen in einer Suspensionskultur produziert. Die in den Kulturüberständen befindlichen Fusionsproteine wurden anschließend affinitätschromatographisch mittels Protein A und dem *Profinia Protein Purification System* (BioRad, München) gereinigt und die Proteinkonzentrationen bestimmt (Tabelle IV.9).

Tabelle IV.9.: Proteinkonzentrationen gereinigter scFv-hlgG1Fc-Antikörper.

Die scFv-Fc-Fusionsproteine wurden in HEK293-6E-Suspensionszellen produziert und aus den Kulturüberständen mittels Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt.

scFv-hlgG1Fc	Proteinkonzentration [mg/mL]	Gesamt-Protein [mg]
LA13-IIE3	0,69	2,8
DF39-A4	0,37	1,5
DF39-E1	0,11	0,4
DF39-E11	0,97	1,5
DF40-B6	0,59	2,4
DF40-G11	0,81	1,2

IV.3.10.2 Titrations-ELISA mit gereinigten scFv-hlgG1Fc-Antikörpern

Nachdem bereits in einem Titrations-ELISA mit den monovalenten scFv-Fragmenten für jeden Klon eine spezifische Bindung an CRP nachgewiesen werden konnte (Abbildung IV.14), wurde in einem weiteren Titrations-ELISA überprüft, in wie weit sich die Bivalenz der scFv-hlgG1Fc-Antikörper auf die CRP-Bindung auswirkte.

Dabei zeigten durchweg alle scFv-Fc-Antikörper gegenüber den jeweiligen scFv-Fragmenten eine verbesserte Bindung an CRP (Abbildung IV.19). Die halbmaximalen Absorptionen wurden schon bei geringeren Konzentrationen des Antikörperfragments (Faktor 5 – 10) erreicht (vgl. Abbildung IV.14). Bis auf eine Ausnahme (DF40-G11) waren die z. T. deutlichen Affinitätsunterschiede zwischen den mutagenisierten scFv-Fragmenten und dem Ausgangs-scFv-Fragment bei den scFv-Fc-Antikörpern nicht mehr erkennbar. Die Derivate zeigten im Wesentlichen die gleichen Bindungseigenschaften wie das korrespondierende Antikörperfragment LA13-IIE3.

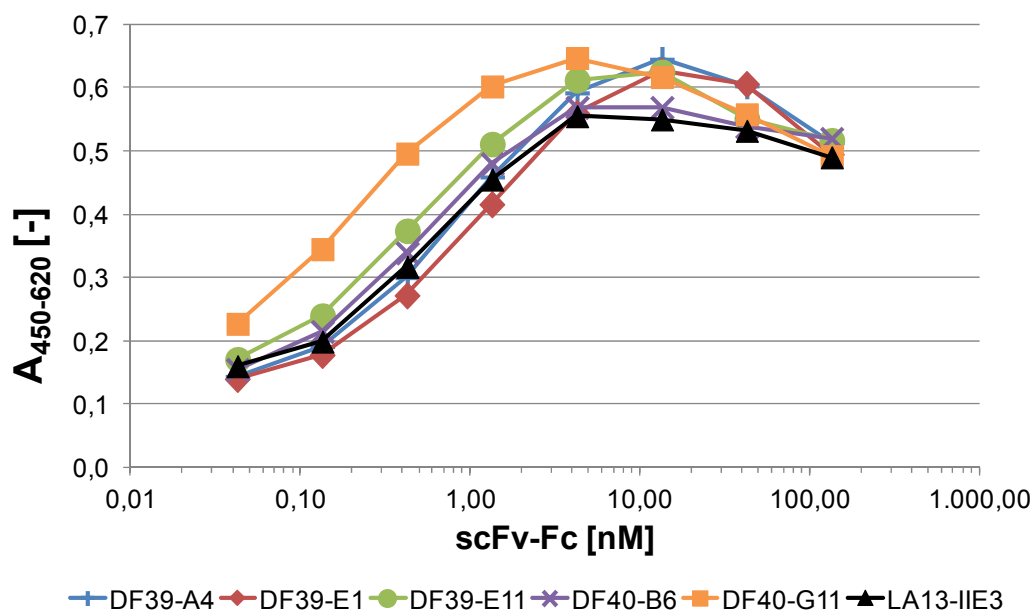


Abbildung IV.19: Nachweis der spezifischen CRP-Bindung von scFv-Fc-Antikörpern.

Die Kavitäten einer MTP wurden mit jeweils 100 ng Antigen (CRP, BSA) beschichtet. Nach Reinigung und Quantifizierung der scFv-Fc-Antikörper wurden Verdünnungsreihen erstellt und die entsprechenden Lösungen auf dem Antigen inkubiert. Die Absorptionen, die bei der Negativkontrolle BSA bestimmt wurden, waren vernachlässigbar (<0,02) und wurden von den jeweiligen Absorptionen auf CRP subtrahiert. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fc-Fusionen erfolgte durch das Antikörper-HRP-Konjugat Ziege- α -Human-IgG (Fc-spezifisch).

IV.3.10.3 Größenausschlusschromatographie von scFv-hIgG1Fc-Antikörpern

Die Tendenz zur Multimerisierung der einzelnen scFv-Fc-Antikörper wurde analog zu der der scFv-Fragmente mittels SEC untersucht. Dabei lagen alle untersuchten scFv-hIgG1Fc-Fusionsproteine als bivalente Monomere vor (Abbildung IV.20). Die bei den korrespondierenden scFv-Fragmenten beobachtete unterschiedlich starke Tendenz zur Ausbildung von Multimeren und Aggregaten (Abbildung IV.17) war nach Fusion mit dem humanen IgG1-Fc-Teil nicht mehr nachzuweisen.

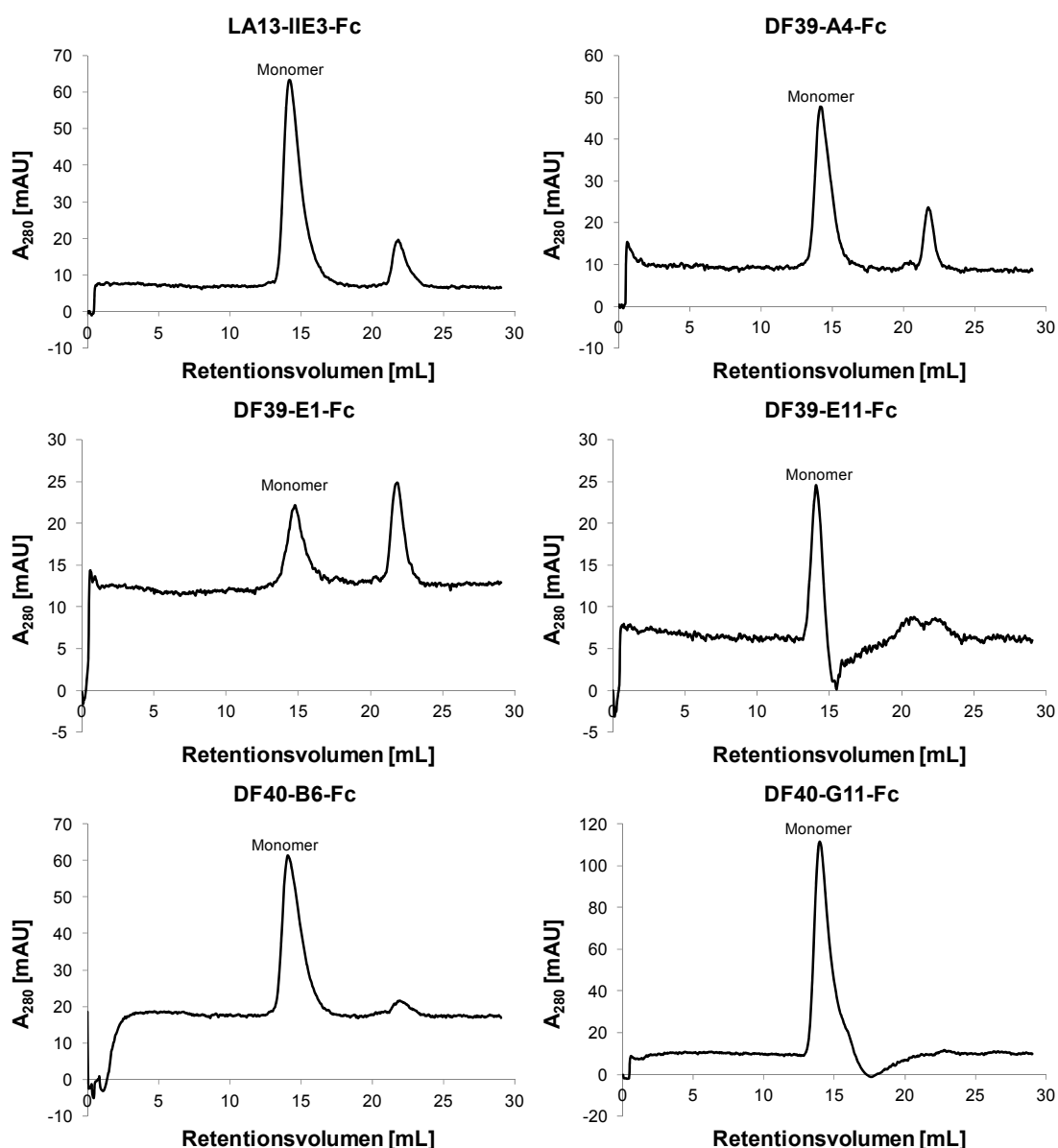


Abbildung IV.20: Größenausschlusschromatographie gereinigter scFv-hIgG1Fc-Antikörper.

Von den gereinigten scFv-hIgG1Fc-Fusionen wurden $\approx 150 \mu\text{g}$ auf eine *Superdex200-10/300-GL*-Säule geladen und bei einer Fließgeschwindigkeit von $0,5 \text{ mL/min}$ (PBS) aufgetrennt. Dargestellt sind die Absorptionssignale bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ je Retentionsvolumen [mL]. Bivalente scFv-Fc-Monomere: 13 mL; -Dimere: 11,5 mL; sonstige Verunreinigungen ($M_r < 10.000$) $\geq 20 \text{ mL}$.

IV.3.10.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) von scFv-hlgG1-Fc-Antikörpern

Die Affinitäten der CRP-spezifischen scFv-hlgG1-Fc-Antikörper wurden mittels SPR mit Hilfe eines *BIAcore2000*-Systems bestimmt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) erfolgte analog zu den entsprechenden scFv-Fragmenten (Abbildung IV.21).

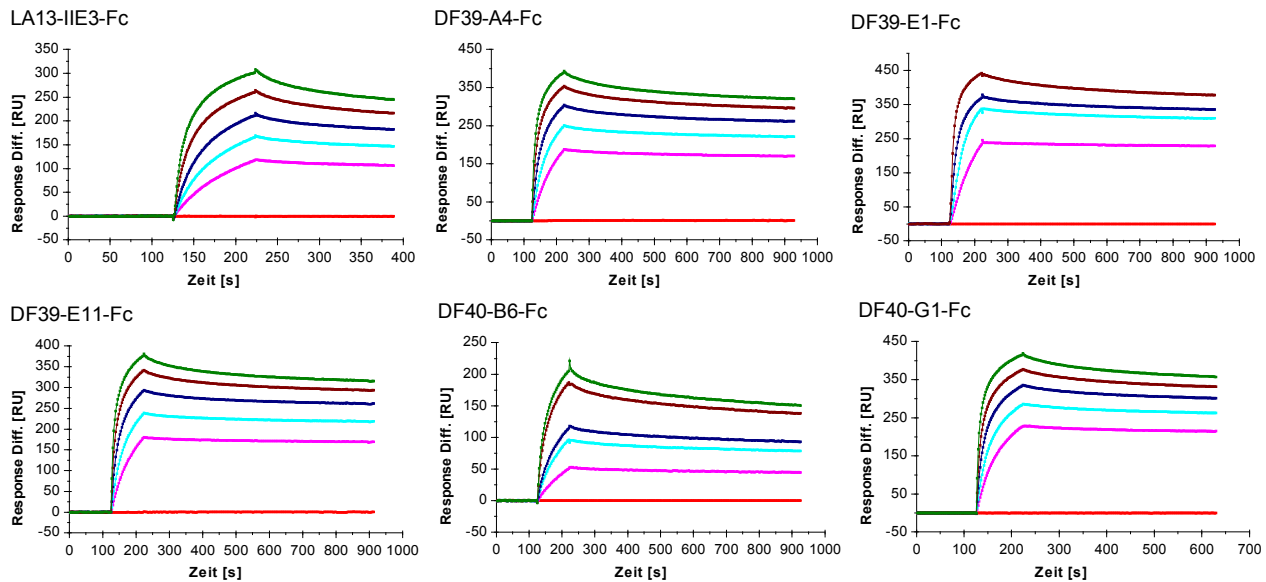


Abbildung IV.21: Affinitätsbestimmung von scFv-hlgG1-Fc-Antikörpern mittels SPR.

Dargestellt sind die Sensogramme mit Response Difference [RU] gegen die Zeit [s] für kinetische Messungen von CRP-spezifischen scFv-hlgG1-Fc-Antikörpern unterschiedlicher Konzentrationen (0 nM (■); 6,25 nM (■); 12,5 nM (■); 25 nM (■); 50 nM (■); 100 nM (■)). Die Messungen erfolgten auf CM5-Chips mit einer Flussrate von 25 μ L/min. Zur Regeneration der Messzelle wurden 25 mM HCl (pH 1,6) eingesetzt. Anhand der theoretischen Kurvenverläufe des mathematischen *drifting baseline fittings* (nicht gezeigt) wurde die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Die scFv-hlgG1-Fc-Antikörper der LA13-IIE3-Derivate zeigten alle eine erhöhte Affinität im Vergleich zum LA13-IIE3. Durch die Fusion an einen humanen Fc-Teil wurden die Affinitätsunterschiede zwischen den einzelnen Kandidaten und dem Ausgangs-scFv-Fragment reduziert (Tabelle IV.10).

Tabelle IV.10: Bestimmung der Affinität der scFv-hlgG1Fc-Antikörper zu CRP.

Bindungsparameter der untersuchten scFv-hlgG1Fc-Fusionen. Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_a) bzw. Dissoziation (k_d). R_{max} = maximale Response, Dissoziationskonstante K_D , Fehler nach χ^2 und das K_D -Verhältnis von Wildtyp zur Mutante.

*Dissoziationskonstante $K_D = k_d k_a^{-1}$, wurde manuell bestimmt.

Antikörperfragment	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	R_{max} [RU]	K_D [M]*	χ^2	$\frac{K_D (Wildtyp)}{K_D (Mutante)}$
LA13-IIE3-Fc	$4,12 \times 10^5$	$1,58 \times 10^{-3}$	341	$3,83 \times 10^{-9}$	8,1	1,0
DF39-A4-Fc	$4,92 \times 10^5$	$4,64 \times 10^{-4}$	491	$9,43 \times 10^{-10}$	18,2	4,1
DF39-E1-Fc	$4,66 \times 10^5$	$6,97 \times 10^{-4}$	699	$1,50 \times 10^{-9}$	50,9	2,6
DF39-E11-Fc	$4,82 \times 10^5$	$4,03 \times 10^{-4}$	484	$8,36 \times 10^{-10}$	14,6	4,6
DF40-B6-Fc	$2,58 \times 10^5$	$4,50 \times 10^{-4}$	211	$1,74 \times 10^{-9}$	38,4	2,2
DF40-G11-Fc	$6,20 \times 10^5$	$6,86 \times 10^{-4}$	548	$1,11 \times 10^{-9}$	16,8	3,5

IV.4 OPTIMIERUNG DER BINDUNG VON ANTIKÖRPERFRAGMENTEN AN GOLDOBERFLÄCHEN

Die Modifikation von CRP-spezifischen Antikörperfragmenten sollte eine gerichtete Immobilisierung auf einem Gold-Chip ermöglichen. Hierfür wurden verschiedene SNAP-Tag-Fusionsproteine angefertigt, die ein auf der Chip-Oberfläche gekoppeltes Substrat spezifisch erkennen und kovalent binden können. Durch die gerichtete Kopplung der Antikörperfragmente sollten Effizienz und Spezifität der CRP-Messung weiter erhöht werden. Hierfür wurden die nach Auswertung aller bisherigen Versuche zwei aussichtsreichsten Kandidaten DF39-E1 und DF40-G11 sowie das Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3 untersucht.

IV.4.1 Produktion von scFv-SNAP-Fusionsproteinen

Die in einer Expressionsanalyse (Zegenhagen, 2011) ermittelten optimalen Produktionsbedingungen (Medium, Temperatur, Induktorkonzentration und Produktionsdauer) dienten als Grundlage für die Produktion der scFv-SNAP-Fusionsproteine im LEX®-Bioreaktor. Die aus dem Periplasma (PE und OS) isolierten Fusionsproteine wurden vereinigt und anschließend mittels Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Dabei wurden in allen Fraktionen Fusionsproteine mit einer relativen Molekülmasse $M_r \approx 50.000$ nachgewiesen (Abbildung IV.22).

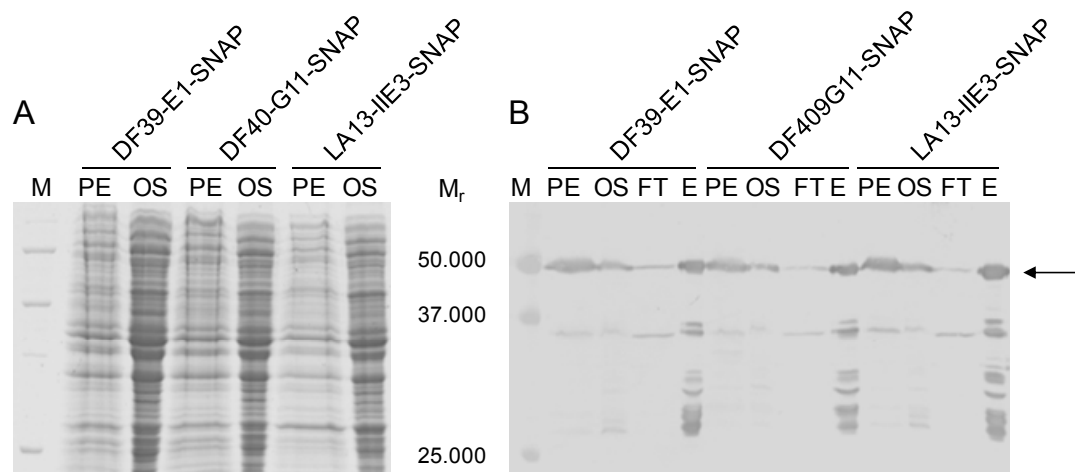


Abbildung IV.22: Produktion und Reinigung von scFv-SNAP-Fusionsproteinen.

Die scFv-SNAP-Fusionsproteine wurden im LEX®-Bioreaktor (ü. N., 18 °C) produziert und aus dem Periplasma (PE und OS) isoliert (A). Anschließend wurden die Fusionsproteine (Pfeil) mittels IMAC gereinigt (B). PE = Periplasmatischer Extrakt, OS = Osmotische-Schock-Fraktion, FT = Durchfluss, E = Elutionsfraktion. Als Proteingrößenstandard wurde der *Precision Plus Protein Standard* (BioRad, München) verwendet. Die Proteine wurden mittels *Coomassie® Brilliant Blue R250* gefärbt (A) oder mit Immunostain mittels *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und *Ziege-α-Maus-IgG* (Fc-spezifisch)-AP-Konjugat nachgewiesen (B).

IV.4.2 Nachweis der spezifischen CRP-Bindung und SNAP-Aktivität

Zunächst wurde die spezifische Bindung an CRP mit Hilfe eines Titrations-ELISAs für alle gereinigten scFv-SNAP-Fusionsproteine nachgewiesen (Abbildung IV.23).

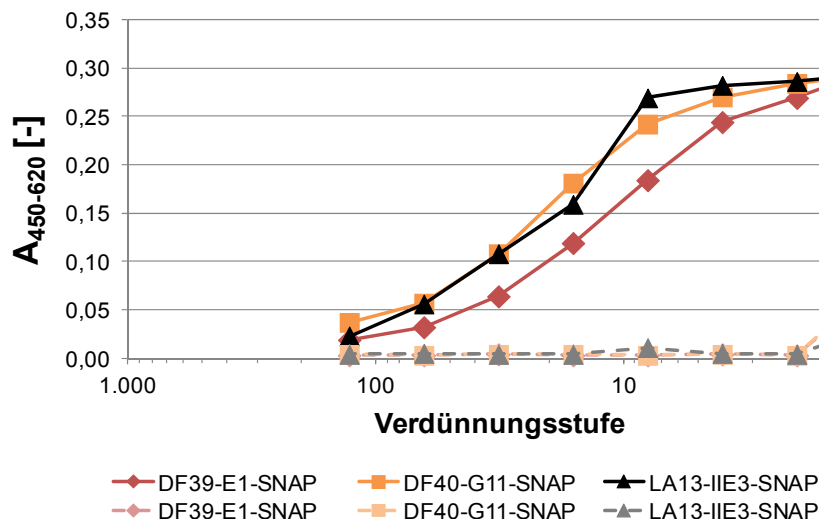


Abbildung IV.23: Nachweis der spezifischen CRP-Bindung gereinigter scFv-SNAP-Fusionsproteine.

Die Kavitäten einer MTP wurden mit jeweils 100 ng Antigen beschichtet. Nach Reinigung der scFv-SNAP-Fusionen wurden Verdünnungsreihen erstellt und auf CRP (durchgezogene Linien) und BSA (gestrichelte Linien) inkubiert. Der Nachweis der gebundenen scFv-SNAP-Fusionen erfolgte durch das Antikörper-HRP-Konjugat Ziege- α -Human-IgG (Fc-spezifisch).

Anschließend wurde die Aktivität des SNAP-Tags der LA13-IIE3-SNAP-Fusion untersucht. Dazu wurden entsprechende Volumina der Elutionsfraktion mit dem Substrat SNAP-Biotin inkubiert und mittels Streptavidin-HRP nachgewiesen. Es konnte für alle Reaktionsbedingungen die SNAP-Tag-Aktivität der LA13-IIE3-SNAP-Fusion gezeigt werden. Die höchste Aktivität wurde bei Substratkonzentration von 10 μ M und einer Inkubation für 60 min erreicht (Abbildung IV.24).

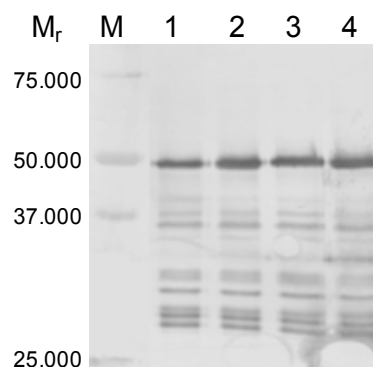


Abbildung IV.24: Nachweis der SNAP-Aktivität des LA13-IIE3-SNAP-Fusionsproteins.

LA13-IIE3-SNAP-Fusionsproteine wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Substrats SNAP-Biotin (5 μ M bzw. 10 μ M) unterschiedlich lang (30 min bzw. 60 min) inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Streptavidin-HRP nachgewiesen.

Bahn M: Precision Plus Protein™ Standard Dual Color

Bahn 1: 5 μ M SNAP-Substrat, 30 min

Bahn 2: 10 μ M SNAP-Substrat, 30 min

Bahn 3: 5 μ M SNAP-Substrat, 60 min

Bahn 4: 10 μ M SNAP-Substrat, 60 min

IV.4.3 CRP-Messung mittels SNAP-gekoppelter scFv-Fragmente im *BIAcore2000*TM-System

Nachdem sowohl die spezifische CRP-Erkennung als auch die Aktivität des SNAP-Tags nachgewiesen werden konnten, wurde die Detektion von CRP mittels SPR-Messungen untersucht. Dafür wurden LA13-IIE3-SNAP-Fusionsproteine an die Goldoberfläche eines CM5-Chips gekoppelt und so die Konzentration unterschiedlicher CRP- bzw. BSA-Lösungen vermessen.

Es konnte ein CRP-spezifisches Messsignal in Abhängigkeit der eingesetzten CRP-Konzentration ermittelt werden. Das gebundene CRP wurde jedoch bei Regeneration mit Laufpuffer sofort entfernt. Im Gegensatz dazu konnte die Bindung von Hitze-denaturiertem CRP auch durch Regeneration mit HCl (25 mM, pH 1,6) nicht gelöst werden, was auf eine unspezifische, „klebrige“ Interaktion hindeutete (Abbildung IV.25).

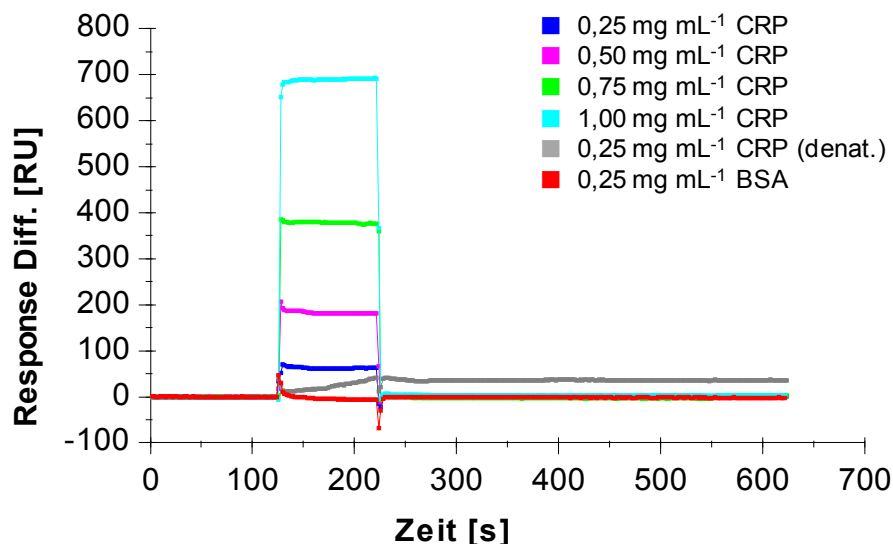


Abbildung IV.25: Nachweis der CRP-Detektion mittels SPR.

LA13-IIE3-SNAP-Fusionsproteine wurden über den SNAP-Tag mittels SNAP-CBG-NH₂ an die Goldoberfläche eines *BIAcore2000*TM-CM5-Chips gekoppelt. Die Messung von jeweils 50 μ L verschiedener CRP- und BSA-Lösungen erfolgte mit einer Flussrate von 30 μ L/min. RU = *Response Units*, denat. = mittels Aufkochen denaturiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Bindungsfähigkeit von nativem CRP verschiedener CRP-spezifischer scFv-Fragmente in einem Sandwich-ELISA untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden scFv-Fragmente an eine MTP immobilisiert und mit nativem CRP inkubiert. Gebundenes CRP wurde anschließend mit Hilfe des monoklonalen *Maus- α -CRP-IgG* (4C28, C6; Diasys) nachgewiesen. Dabei konnte für die scFv-Fragmente IsP26-G1 und LA13-IIE3, sowie dessen Derivate DF39-E1 und DF40-G11 keine Bindung von frei in Lösung befindlichem nativem CRP, jedoch eine sehr gute Bindung des immobilisierten Antigens nachgewiesen werden. Die beiden in dieser Arbeit isolierten konformationellen Binder IsP26-F11 und

IsP29-H1 (Abschnitt IV.2) verhielten sich *vice versa*. Wurden im Gegensatz das scFv-Fragment TOB5-D4 bzw. dessen Derivat IsP8-IIIE7 verwendet, konnte ein entsprechender Nachweis beider CRP-Typen erfolgen (Abbildung IV.26).

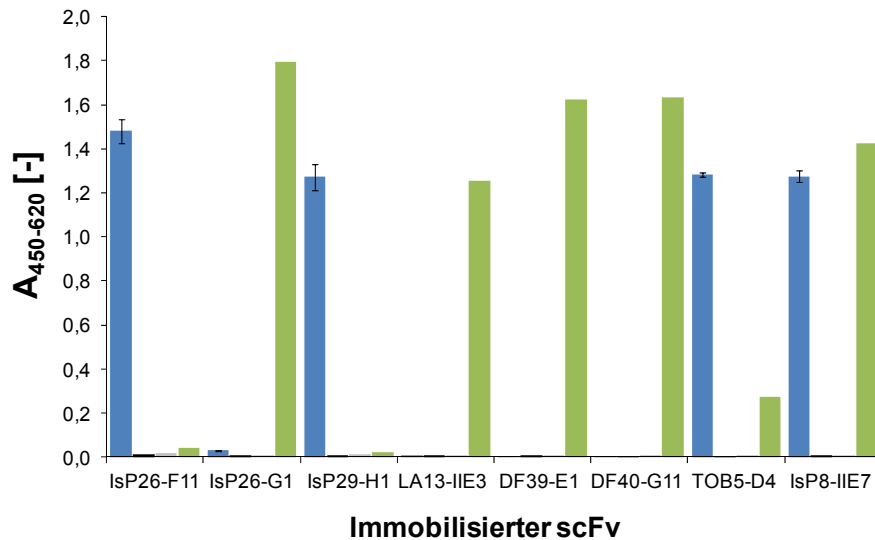


Abbildung IV.26: Nachweis der Bindung von nativem CRP mittels Sandwich-ELISA.

Jede Vertiefung wurde mit je 100 ng scFv-Fragment beschichtet. Die immobilisierten scFv-Fragmente (jeweils Triplikate) wurden anschließend mit 1 µg CRP (in PBS) inkubiert. Nach einem Waschschritt erfolgte der Nachweis von gebundenem CRP mit Hilfe des monoklonalen *Maus-α-CRP-IgG* (4C28, C6; Diasys) und des Antikörper-HRP-Konjugats *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch) (■). Als Kontrollen zum Nachweis unspezifischer Bindungen des monoklonalen *Maus-α-CRP-IgG* bzw. des Nachweis-Antikörpers *Ziege-α-Maus-IgG* erfolgte eine Inkubation ohne CRP (■) bzw. zusätzlich ohne CRP und ohne *Maus-α-CRP-IgG* (■). Als Positivkontrolle erfolgte der Nachweis der CRP-Bindung *vice versa*: immobilisiertes CRP (100 ng) wurde mit löslichen scFv-Fragmenten inkubiert und anschließend mittels *Maus-α-myc-IgG* (9E10) und *Ziege-α-Maus-IgG* (Fab-spezifisch)-HRP-Konjugat nachgewiesen (■).

IV.5 CHARAKTERISIERUNG UND EVALUIERUNG DES QUARZKRISTALLMIKROWAAGEN-SENSORS MIT HILFE VERSCHIEDENER ANTIKÖRPERFRAGMENTE

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl verschiedener Antikörperfragmente und -formate biochemisch charakterisiert und miteinander verglichen. Abschließend sollte eine Charakterisierung und Evaluierung des im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 578 „Vom Gen zum Produkt“ entwickelten QCM-Sensors erfolgen. Hierfür wurden mit Hilfe verschiedener Antikörperfragmente QCM-Messungen durchgeführt.

IV.5.1 Messung von CRP aus einer Lösung mit einem Quarzkristallmikrowaagen-Sensor

Für die CRP-Detektion wurden zunächst die Antikörperfragmente LA13-IIIE3 und der nach Evaluierung aller bisherigen Analysen beste Kandidat DF39-E1 aufgrund seiner erhöhten Affinität und Stabilität verwendet.

An den Glutardialdehyd-SAM (*self assembling monolayer*) wurden zunächst die scFv-Fragmente gekoppelt, was zu einem Abfall der Frequenz von ca. 600 Hz führte. Durch die Sättigung unspezifischer Bindungen mit Casein wurden eine weitere Frequenzabnahmen von 30 Hz (LA13-IIIE3) bzw. 130 Hz (DF39-E1) beobachtet. Die Vermessung unterschiedlicher CRP-Konzentrationen (250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL und 1,0 mg/mL) resultierte in Frequenzabnahmen von 45 – 338 Hz (LA13-IIIE3) bzw. 37 – 329 Hz (DF39-E1). Die Abnahme der Frequenz war dabei proportional zur CRP-Konzentration. Nach der Untersuchung unspezifischer Bindung durch Injektion einer BSA-Lösung (1 mg/mL), die zu keiner detektierbaren Frequenzänderung führte, erfolgten weitere CRP-spezifische Messungen (Abbildung IV.27 und Abbildung IV.28).

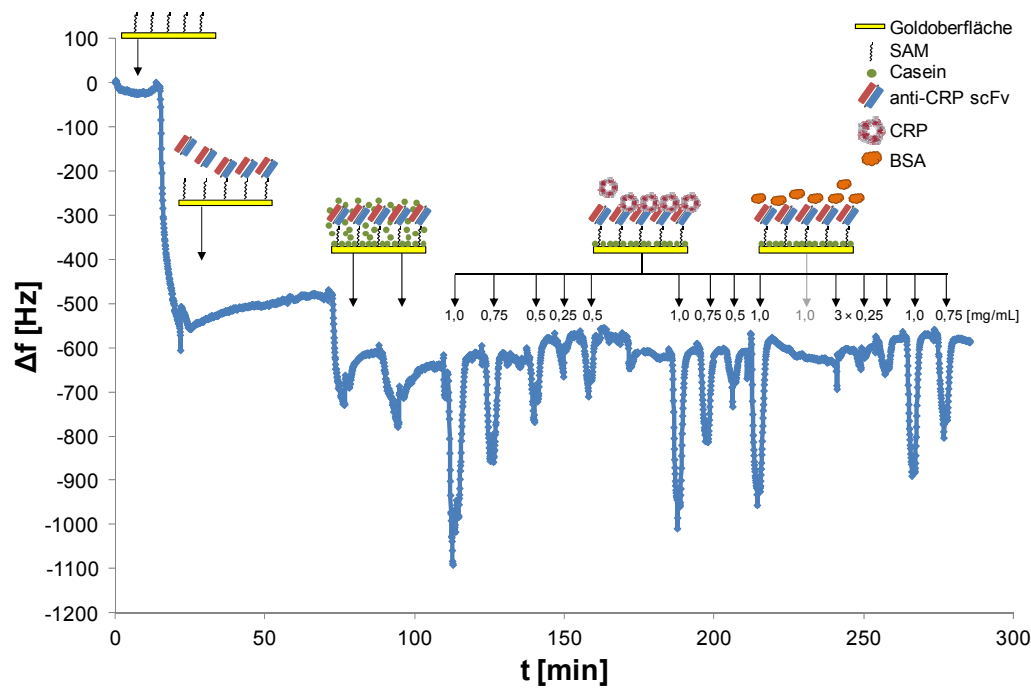


Abbildung IV.27: Spezifische QCM-Messung von CRP mit Hilfe des LA13-IIE3-scFv-Fragments.

Gezeigt sind mehrfache Messungen der Bindung von CRP an einen QCM-Sensor, an dem das CRP-spezifische LA13-IIE3-scFv-Fragment gekoppelt wurde. Es erfolgten nacheinander 15 Regenerationszyklen (14xCRP, 1xNegativkontrolle). Nach Massenzunahmen bedingt durch Anlagerung der CRP-spezifischen scFv-Fragmente (ca. 10 min), durch Casein-Absättigung (90 min) bzw. durch CRP-Detektion (109 min bis 274 min) kam es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (225 min, grauer Pfeil).

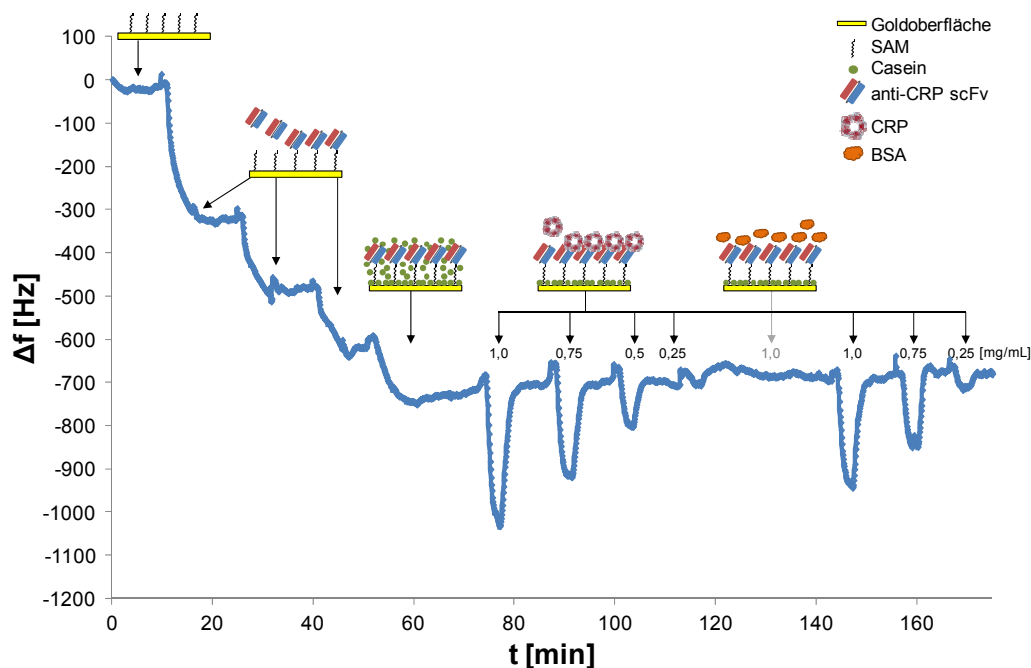


Abbildung IV.28: Spezifische QCM-Messung von CRP mit Hilfe des DF39-E1-scFv-Fragments.

Gezeigt sind mehrfache Messungen der Bindung von CRP an einen QCM-Sensor, an dem das CRP-spezifische DF39-E1-scFv-Fragment gekoppelt wurde. Es erfolgten nacheinander acht Regenerationszyklen (7xCRP, 1xNegativkontrolle.). Nach Massenzunahmen bedingt durch Anlagerung der CRP-spezifischen DF39-E1-Fragmente (ca. 10 min), durch Casein-Absättigung (50 min) bzw. durch CRP-Detektion (73 min bis 166 min) kam es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (125 min, grauer Pfeil).

Anschließend erfolgte die Auswertung und Visualisierung der Frequenzmessungen, wobei eine Detektion von CRP unterschiedlicher Konzentrationen in wiederholten Zyklen mit dem mikrofluidischem System unter Verwendung beider scFv-Fragmente generell möglich war. Im Gegensatz dazu konnten die korrespondierenden scFv-hlgG1Fc-Antikörper zwar an den Sensor-Chip gekoppelt werden, jedoch wurde keine Bindung an CRP nachgewiesen, obwohl diese im ELISA gebunden haben (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Messungen bei geringen CRP-Konzentrationen vor allem beim DF39-E1-scFv-Fragment jedoch zunehmend „ungenauer“, so dass die ermittelten Frequenzunterschiede (Δf) einer höheren Schwankung unterlagen.

Durch die Auftragung der Mittelwerte der gemessenen Frequenzänderungen gegen die jeweilige CRP-Konzentration wurde für beide verwendeten scFv-Fragmente ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Frequenzänderung und eingesetzter CRP-Konzentration gezeigt, wobei die gemessenen Frequenzänderungen bei Verwendung des DF39-E1-scFv-Fragments jeweils unter denen des LA13-IIE3-scFv-Fragments lagen (Abbildung IV.29).

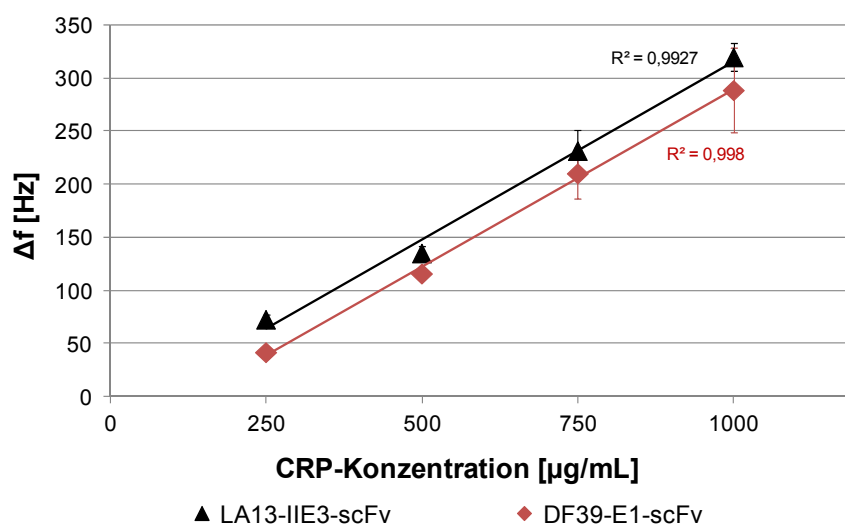


Abbildung IV.29: Korrelation der Frequenzänderungen (Δf) mit den zu bestimmenden CRP-Konzentrationen. Die Mittelwerte der gemessenen Frequenzänderungen wurden berechnet und gegen die jeweilige CRP-Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind außerdem die jeweiligen Standardabweichungen und die entsprechenden Regressionsgeraden mit zugehörigem Regressionskoeffizienten R^2 .

Die Normierung der einzelnen Messungen und Extrapolarisation führte unter Berücksichtigung des 2,5fachen Wertes der systembedingten *Baseline drifts* von 10 Hz zur Abschätzung der Anzahl der möglichen CRP-Messungen (Abbildung IV.30). Dabei wurde für beide scFv-Fragmente eine Verringerung der Sensitivität der Sensorchips mit zunehmender Anzahl an CRP-Messungen gezeigt. Bei Verwendung des DF39-E1-scFv-Fragments sind deutlich weniger

CRP-Messungen (10) als mit dem LA13-IIE3-scFv-Fragment (ca. 50) möglich, bevor die gemessenen Frequenzunterschiede in den Bereich der systembedingten Schwankungen fallen.

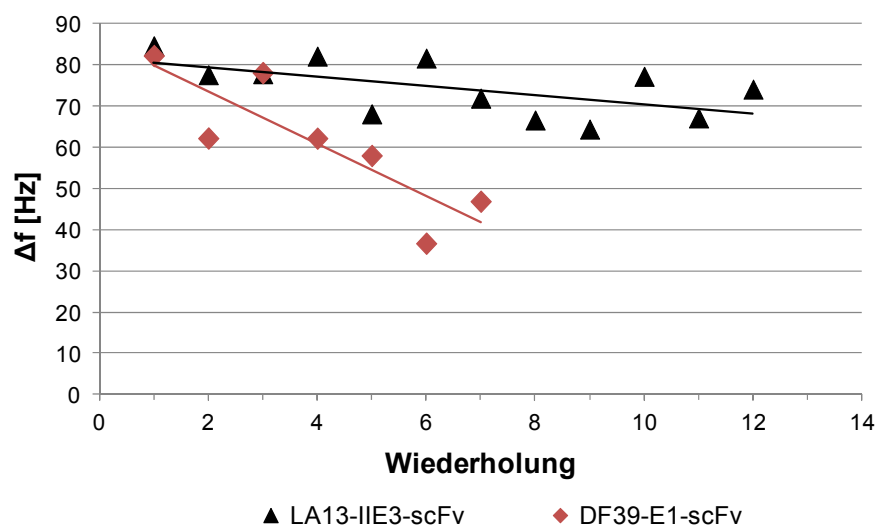


Abbildung IV.30: Abhängigkeit der gemessenen Frequenzunterschiede von der Anzahl der Wiederholungen.

Die einzelnen gemessenen Frequenzänderungen wurden auf Δf bei 250 $\mu\text{g/mL}$ normiert und als einzelne Wiederholung aufgetragen. Hierdurch konnte eine Abhängigkeit der gemessenen Δf -Werte von der Anzahl der Wiederholungen gezeigt werden. Durch Extrapolation der Trendlinien ist eine Abschätzung der möglichen Messzyklen möglich.

In einem weiteren Schritt wurden die in dieser Arbeit neu identifizierten Binder IsP26-F11, IsP26-G1 und IsP28-H1 untersucht, da sie aufgrund ihrer Eigenschaften (erhöhte Affinität bzw. Erkennen konformationeller Epitope) besonders für einen Einsatz auf dem QCM-Sensor geeignet schienen. Jedoch konnte keines dieser drei scFv-Fragmente an die Oberfläche des QCM-Sensors gekoppelt werden, wodurch eine weitere Charakterisierung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden das CRP-spezifische TOB5-D4-scFv-Fragment, dessen hlgG1Fc-Fusion, sowie der aussichtsreichste Kandidat IP8-IIE7-scFv (Popp, 2011) aus der Antikörpergenbibliothek „B“ untersucht. Sowohl für die beiden scFv-Fragmente TOB5-D4 (Abbildung IV.31 A1) und IsP8-IIE7 (Daten nicht gezeigt), als auch für den TOB5-D4-scFv-Fc-Antikörper (Abbildung IV.31 A2) wurde eine konzentrationsabhängige, CRP-spezifische Bindung gezeigt. Die CRP-Konzentrationen waren dabei um den Faktor 10 geringer (25 $\mu\text{g/mL}$) als bei der Verwendung des LA13-IIE3-scFv-Fragments und dessen Derivat DF39-E1 (250 $\mu\text{g/mL}$). Bei der Auftragung der Mittelwerte der gemessenen Frequenzänderungen gegen die jeweilige CRP-Konzentration wurde für alle verwendeten Antikörperfragmente ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Frequenzänderung und eingesetzter CRP-Konzentration nachgewiesen. Bei Verwendung des TOB5-D4-scFv-Fragments wurden die höchsten, bei der hlgG1Fc-Fusion die geringsten absoluten Ausschläge verzeichnet (Abbildung IV.31 B).

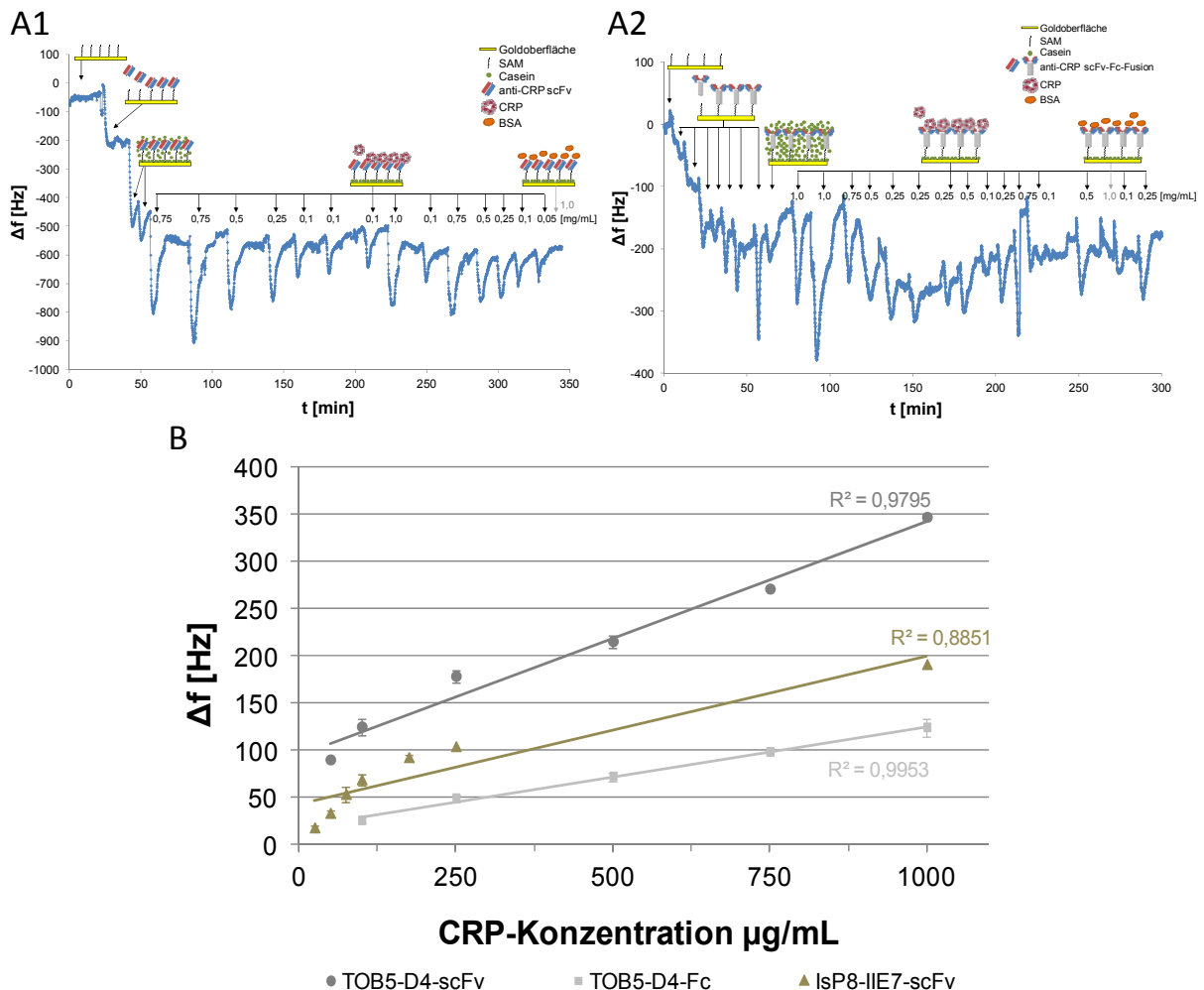


Abbildung IV.31: Spezifische QCM-Messungen von CRP und Analyse mit Hilfe verschiedener TOB5-D4-Antikörperfragmente.

(A) QCM-Messung von CRP: mehrfache Messungen der spezifischen Bindung von CRP an einen QCM-Sensor nach Kopplung des TOB5-D4-scFv-Fragments (A1) bzw. des TOB5-D4-scFv-Fc-Antikörpers (A2). Es erfolgten nacheinander 15 bzw. 16 Regenerationszyklen (14 bzw. 15×CRP, 1×Negativkontrolle). Nach Massenzunahmen durch Anlagerung der CRP-spezifischen Antikörperfragmente, durch Casein-Sättigung bzw. durch CRP-Detektion (schwarze Pfeile) kam es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (graue Pfeile). (B) Korrelation der Frequenzänderungen (Δf) mit den zu bestimmenden CRP-Konzentrationen: Die Mittelwerte der gemessenen Frequenzänderungen wurden gegen die jeweilige CRP-Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind außerdem die jeweiligen Standardabweichungen und die entsprechenden Regressionsgeraden mit zugehörigem Regressionskoeffizienten R^2 .

Nach diesen ersten QCM-Messungen wurde das TOB5-D4-scFv-Fragment aufgrund seiner hohen Sensitivität, Regenerierbarkeit und Stabilität zur weiteren Charakterisierung des QCM-Systems gewählt. Mit einem mit diesem Antikörperfragment gekoppelter QCM-Chip konnten über 14 Tage verteilt insgesamt mehr als 100 CRP-spezifische Messungen durchgeführt werden. Die letzten 40 Messzyklen mit unterschiedlichen CRP-Konzentrationen von 50 bis 1000 $\mu\text{g/mL}$ erfolgten am 14. Tag nach der Kopplung des scFv-Fragments an die Chipoberfläche (Abbildung IV.32 A). Die gemessenen Frequenzunterschiede Δf dividiert durch die CRP-Konzentration wurden gegen die zugehörige Messung aufgetragen. Dieses Verhältnis blieb nach anfänglicher Abnahme (ca. 10 – 15 Messungen) sehr stabil, was die hohe

Reproduzierbarkeit dieser QCM-Messungen widerspiegelt (Abbildung IV.32 B). Eine Normalisierung wurde durchgeführt, um die absoluten Frequenzunterschiede der jeweiligen gemessenen CRP-Konzentration, die aufgrund der Messung an verschiedenen Tagen teilweise voneinander abwichen, auszugleichen. Mit Hilfe dieser Metaanalyse wurde für alle Messwerte ein linearer Zusammenhang des gemessenen Frequenzunterschieds und der zugehörigen CRP-Konzentration nachgewiesen (Abbildung IV.32 C).

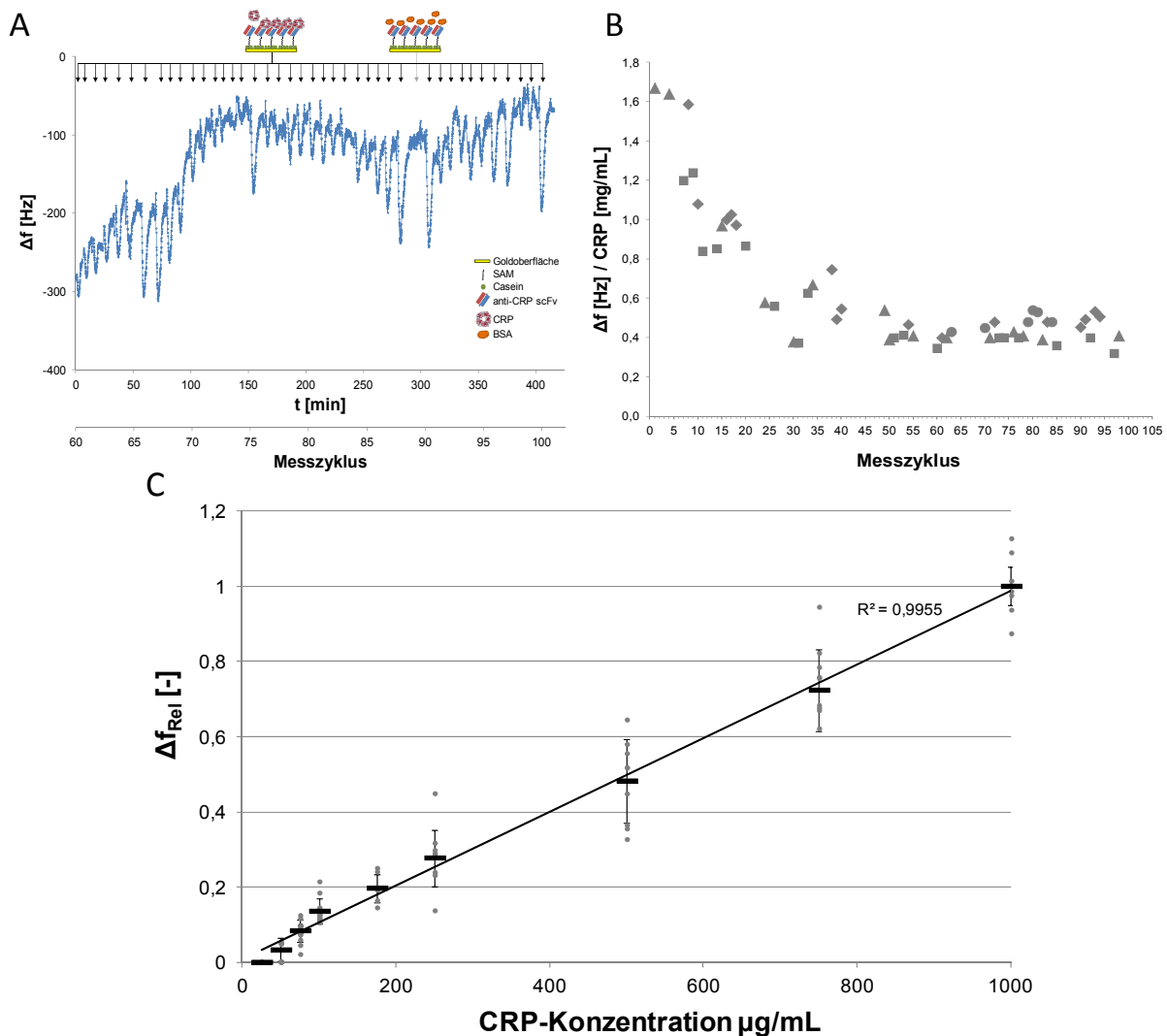


Abbildung IV.32: Spezifische QCM-Messung von CRP und Analysen mit Hilfe des Antikörperfragments TOB5-D4-scFv.

(A) QCM-Messung von CRP: mehrfache Messungen der spezifischen Bindung von CRP (50–1000 $\mu\text{g/mL}$) an einen QCM-Sensor nach Kopplung des TOB5-D4-scFv-Fragments und ca. 60 Einzelmessungen. Es erfolgten nacheinander 41 Regenerationszyklen (40 \times CRP, 1 \times Negativkontrolle). Nach Massenzunahmen bedingt durch CRP-Detektion (schwarze Pfeile) kam es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (grauer Pfeil). (B) Nachweis der Reproduzierbarkeit der QCM-Messungen: die gemessenen Frequenzunterschiede Δf dividiert durch die jeweilig vermessene CRP Konzentration (\blacksquare 50 $\mu\text{g/mL}$, \blacklozenge 75 $\mu\text{g/mL}$, \blacktriangle 100 $\mu\text{g/mL}$ und \bullet 175 $\mu\text{g/mL}$) sind gegen den zugehörigen Messzyklus aufgetragen. (C) Metaanalyse: die normierten Werte der jeweiligen Frequenzunterschiede der 100 Einzelmessungen wurden gegen die zugehörige CRP-Konzentration aufgetragen (graue Punkte). Dargestellt sind zudem die Δf_{Rel} -Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen (Striche), die zugehörigen Standardabweichungen und die entsprechende Regressionsgerade mit zugehörigem Regressionskoeffizienten R^2 (alles schwarz).

Unter Verwendung des TOB5-D4-scFv-Fragments war es also über einen sehr langen Messzeitraum möglich, auch geringe CRP-Konzentrationen mit PBS als Laufpuffer sehr genau zu bestimmen. Um zu überprüfen, ob es mit diesem System auch möglich ist, CRP aus einem Gemisch unbekannter Proteine spezifisch zu erkennen, wurden abschließende Messungen von mit CRP *gespiktem* Fetalem Kälberserum (FCS) durchgeführt. Hierfür wurde der bereits mit dem TOB5-D4-scFv gekoppelte QCM-Chip eingesetzt und als Laufpuffer verschiedene FCS-PBS-Lösungen verwendet. Jedoch konnte bereits bei einer 10%igen FCS-Lösung kein CRP-spezifisches Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde überprüft, ob verschiedene kommerziell erhältliche CRP-spezifische IgG-Moleküle an den Chip gekoppelt und zur CRP-Detektion verwendet werden können. Allerdings konnte von den beiden verwendeten α -CRP-IgGs der Antikörper 4C28-C6-IgG2a gar nicht immobilisiert werden, wohingegen der 4C28-CRP36-IgG2a zwar gekoppelt werden konnte, aber kein Nachweis von CRP möglich war (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob generell keine vollständigen IgG-Moleküle auf dem in dieser Arbeit verwendeten QCM-Sensor eingesetzt werden können, wurde ein BSA-spezifischer Antikörper (HSA-11-IgG2a) gekoppelt und anschließend entsprechende Messungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten mehrere konzentrationsabhängige, BSA-spezifische Bindungen nachgewiesen werden. Die messbaren Antigenkonzentrationen lagen mit 5 – 50 mg/mL jedoch deutlich über der maximal einsetzbaren CRP-Konzentration von 1 mg/mL.

IV.5.2 Messungen von Lysozym aus einer Lösung mit einem Quarzkristallmikrowaagen-Sensor

Mit Hilfe einer weiteren Kombination aus Antigen und Antikörperfragment wurde im Folgenden das in dieser Arbeit verwendete QCM-System weiter charakterisiert und analysiert. Wegen seiner hohen Stabilität, der im Vergleich zu CRP einfacheren Struktur, sowie der guten Verfügbarkeit wurde als Antigen Lysozym und als Antikörperfragment das Lysozym-spezifische D1.3-scFv-Fragment verwendet. Die Vorbereitung der Sensorchips (Ausbildung des SAM, Kopplung der Antikörperfragmente sowie Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit Casein) erfolgte analog zu den CRP-Sensorchips.

Zweiundvierzig Messungen unterschiedlicher Lysozym-Konzentrationen (0,1 – 10,0 mg/mL) verteilt über einen Zeitraum von 18 Tagen resultierten in Frequenzabnahmen von 46 – 890 Hz. Die Abnahme der Frequenz war dabei proportional zur Lysozym-Konzentration (Abbildung IV.33 A). Die Injektion der BSA-Lösung zum Nachweis einer unspezifischen Bindung führte zu keiner detektierbaren Frequenzänderung (Daten nicht gezeigt). Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Frequenzänderung und eingesetzter Lysozym-Konzentration gezeigt (Abbildung IV.33 B).

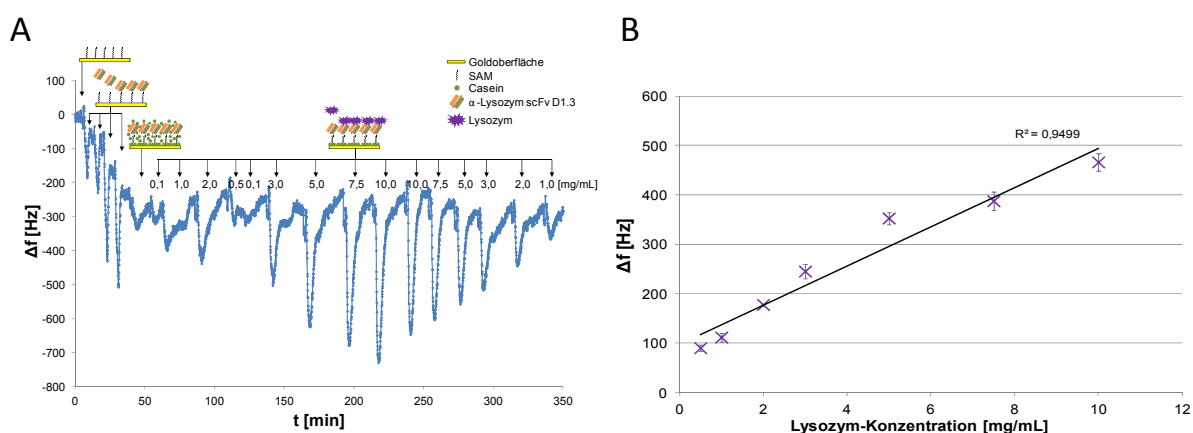


Abbildung IV.33: Spezifische QCM-Messungen von Lysozym und Analysen mit Hilfe des α -Lysozym scFv-Fragments D1.3.

(A) QCM-Messung von Lysozym: wiederholende Messungen der spezifischen Bindung von Lysozym (0,1 – 10,0 mg/mL) an einen QCM-Sensor nach Kopplung des D1.3-scFv-Fragments und Abblocken unspezifischer Bindungen mittels Casein. Es erfolgten nacheinander 15 Regenerationszyklen. Nach Massenzunahmen bedingt durch Anlagerung der Lysozym-spezifischen scFv-Fragmente (ca. 35 min), durch Casein-Absättigung (55 min) bzw. durch Lysozym-Detektion (schwarze Pfeile; 60 min bis 350 min) kam es bei späteren Messungen zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit BSA (Daten nicht gezeigt). (B) Korrelation der Frequenzänderungen (Δf) mit den zu bestimmenden Lysozym-Konzentrationen: die Mittelwerte der mehrfachen Messungen der Frequenzänderungen wurden gegen die jeweilige Lysozym-Konzentration aufgetragen.

Die Detektion von Lysozym in PBS als Laufpuffer wurde erfolgreich über mehrere Wochen nachgewiesen. Als nächstes wurde überprüft, ob mit demselben Lysozym-QCM-Sensor-Chip auch eine Lysozym-spezifische Detektion in FCS möglich ist. Hierfür wurden zunächst erneut

5,0 mg/mL Lysozym in PBS nachgewiesen und anschließend sukzessive der Volumenanteil an FCS im Laufpuffer (PBS) erhöht. Nach Einschwingphasen von mehreren Minuten, in denen sich das System an die neuen Pufferbedingungen adaptierte, erfolgten die Messungen unterschiedlicher Lysozym-Konzentrationen. Dabei war zu beobachten, dass die gemessenen absoluten Frequenzänderungen (108 – 1800 Hz) deutlich über denen der Messungen in PBS (46 – 890 Hz) lagen. Abschließend konnte nach Umstellung auf PBS als Laufpuffer weiterhin Lysozym unterschiedlicher Konzentrationen detektiert werden (Abbildung IV.34).

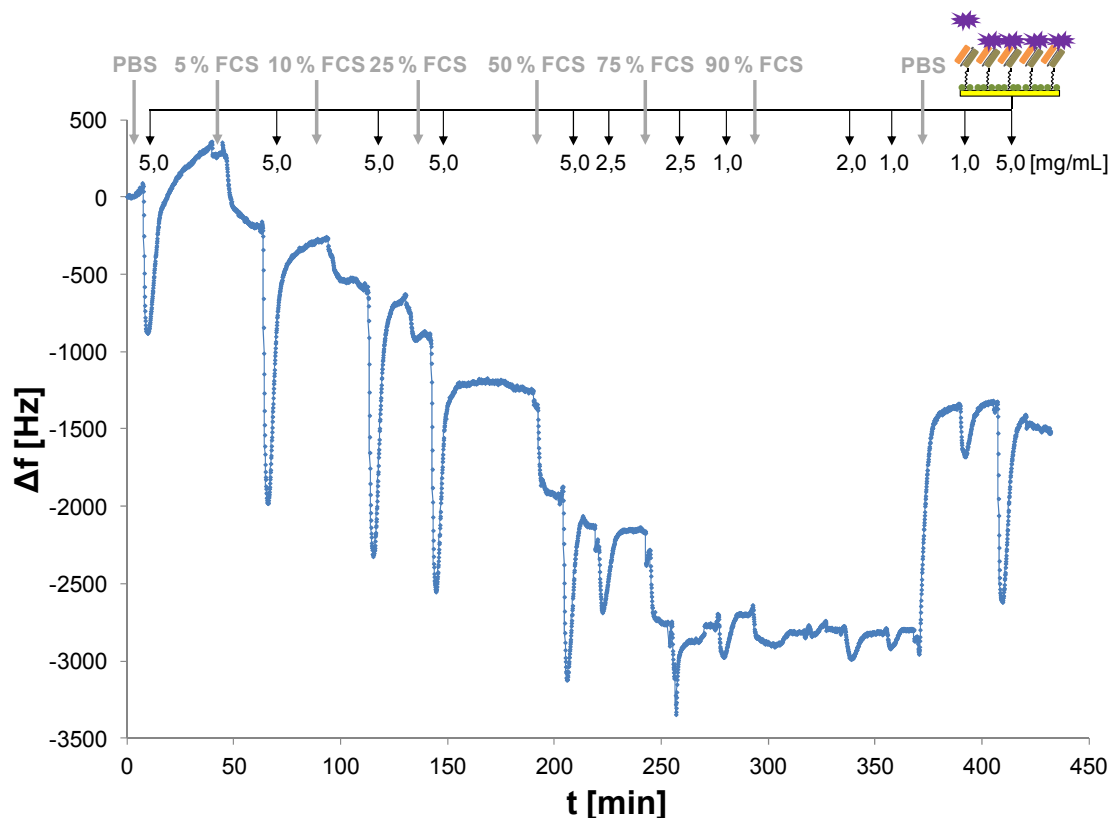


Abbildung IV.34: Spezifische QCM-Messung von Lysozym aus Fetalem Kälberserum (FCS) mit Hilfe des α -Lysozym scFv-Fragments D1.3.

Wiederholende QCM-Messungen der spezifischen Bindung von Lysozym (1,0 – 5,0 mg/mL) in Fetalem Kälberserum (FCS) an einen QCM-Sensor nach Kopplung des D1.3-scFv-Fragments und ca. 40 Einzelmessungen. Es erfolgten nacheinander 12 Regenerationszyklen (3× in PBS und 9× in unterschiedlichen FCS-Lösungen). Nach Massenzunahmen bedingt durch Lysozym-Detektion (schwarze Pfeile), wurde der volumetrische Anteil an FCS im Laufpuffer sukzessive erhöht (graue Pfeile). Abschließend konnte nach Umstellung auf PBS als Laufpuffer weiterhin Lysozym unterschiedlicher Konzentrationen (in PBS) detektiert werden.

Somit konnte mit diesem QCM-System zum ersten Mal eine spezifische Antigen-Detektion aus einem Protein-Gemisch erfolgen, was essentielle Voraussetzung für die spätere Anwendung in einem *Lab-on-a-Chip*-System ist.

In der nachfolgenden Tabelle IV.11 ist ein Überblick über alle in dieser Arbeit zur QCM-Messung verwendeten Antikörperfragmente gegeben.

Tabelle IV.11: Übersicht der für QCM-Messungen verwendeten Antikörperfragmente.

Aufgelistet sind die zu detektierenden Antigene und die dazu verwendeten Antikörperfragmente unter Angabe der Anzahl der möglichen Messungen, der messbaren Antigenkonzentration, der Baseline-Schwankungen, sowie der ermittelten Frequenzänderung und der Haltbarkeit des Sensorchips.

Antigen	Antikörper-Fragment	Kopplung möglich	Anzahl der möglichen Messungen	Messbare Antigenkonzentration [mg/mL]	Schwankungen der Baseline [Hz]	Ermittelte Frequenzänderung [Hz]	Haltbarkeit des Sensorchips [d]
CRP	DF39-E1-scFv	+	7 / 10 [†]	0,25 – 1,0	10	37 – 329	n.d.
	DF39-E1-Fc	+	-	-	5	-	-
	DF40-G11-scFv	+	5	0,5 – 1,0	<5	36 – 164	n.d.
	IsP8-IIIE7-scFv	+	13	0,025 – 1,0	<5	15 – 191	2
	IsP26-F11-scFv	-	-	-	10	-	-
	IsP26-G1-scFv	-	-	-	5	-	-
	IsP29-H1-scFv	-	-	-	5	-	-
	LA13-IIIE3-scFv	+	14 / 50 [†]	0,25 – 1,0	10	45 – 558	2
	LA13-IIIE3-Fc	+	-	-	5	-	-
	TOB5-D4-scFv	+	20	0,05 – 1,0	5	90 – 350	mind. 3
	TOB5-D4-scFv	+	>100	0,025 – 1,0	<5	23 – 253	>14
	TOB5-D4-Fc	+	14 [‡]	0,1 – 1,0	<5	23 – 134	2 [‡]
	4C28-C6-IgG2a	-	-	-	5	-	-
	4C28-CRP36-IgG2a	+	-	-	5	-	-
Lysozym	D1.3-scFv	+	>42	0,5 – 10	5 – 10	46 – 889	>18
Lysozym*	D1.3-scFv	+	>9	1,0 – >5,0	5 – 10	107 – 1800	n.d.
BSA	HSA-11-IgG2a	+	>11 [†]	5,0 – 50	10 – 15	198 – 1566	8 [‡]

* Messung in FCS, † abgeschätzt, ‡ Chip zuvor defekt, n.d. nicht bestimmt

V DISKUSSION

In der medizinischen Diagnostik steigt die Nachfrage nach mikrofluidischen *Lab-on-a-Chip*-Systemen, die eine einfache, kostengünstige und zeitsparende *Point-of-care*-Diagnostik ermöglichen, zunehmend. Besonders in Entwicklungsländern, in denen es an für die schnelle Diagnostik essentiellen Voraussetzungen wie Chemikalien, Laboren mit geschultem Personal und der notwendigen Infrastruktur mangelt, ist ein Einsatz von *Lab-on-a-Chip*-Systemen erstrebenswert (Yager *et al.*, 2006). Aber auch in Industrieländern ist die Verwendung solcher Systeme aufgrund der schnellen und patientennahen Diagnostik von Vorteil.

Das CRP ist aufgrund seiner Bedeutung als wichtiger Entzündungsparameter besonders für den Einsatz einer *Point-of-care*-Diagnostik von Nutzen. Die CRP-Konzentration im Blutserum kann bei bakteriellen Infektionen innerhalb weniger Stunden auf 10 mg/mL, dem 100 – 1.000fachen des Normalwertes, ansteigen (Husebekk & Hansson, 2000; Kushner, 2001). Ferner ist eine regelmäßige Überwachung des CRP-Werts auch bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen von Vorteil, da diese mit einer leicht erhöhten CRP-Konzentration einhergehen (Koenig *et al.*, 1999). Zudem ist eine schnelle Reaktion auf erhöhte CRP-Messwerte z. B. bei postoperativen Kontrollen auch außerhalb von Kliniken und Laboratorien von großer Bedeutung, da erhöhte CRP-Werte auf Entzündungsreaktionen und etwaige Komplikation hindeuten können (Esposito *et al.*, 2005). Eine zeitnahe Bestimmung vor Ort, z. B. direkt in der Arztpraxis, ist deshalb von großem Interesse.

Aus diesem Grunde wurde innerhalb des Sonderforschungsbereiches 578 „Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse: Vom Gen zum Produkt“ ein mikrofluidisches *Lab-on-a-Chip*-System zur spezifischen Diagnostik von CRP etabliert (Michalzik *et al.*, 2005a; Al-Halabi, 2008; Balck *et al.*, 2011). In diesem ist für die Anreicherung des im Blutserum befindlichen CRPs eine Affinitätszelle erforderlich, mit deren Hilfe auch sehr geringe CRP-Konzentrationen spezifisch gebunden werden können. Nach einem Waschschriff, bei dem alle anderen nicht gebundenen Serumsbestandteile entfernt werden, werden die angereicherten CRP-Moleküle eluiert und anschließend in einer Detektionszelle nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe einer Quarzmikrowaage (QCM), die als Immunsensor dient (Ward & Buttry, 1990; Kurosawa *et al.*, 2003b). In den letzten Jahren wurden zahlreiche QCM-basierte CRP-Assays entwickelt (Kurosawa *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004), bei denen z. B. eine Amplifikation des Signals durch Kopplung des Analyten CRP an *Latexbeads* (*latex piezoelectric immunoassay*, LPIA) erzielt wurde (Kurosawa *et al.*, 2000; Kurosawa *et al.*, 2003b). Kommen die mit CRP-spezifischen Antikörpern beschichteten *Latexbeads* in Kontakt mit dem nachzuweisenden Stoff, führt dies zu einer Agglomeration,

welche mit einer QCM detektiert wird. Bei einem weiteren QCM-basierten Immunsensor für die CRP-Diagnostik erfolgten die Tests nicht in einem Fließsystem. Hier wurden die QCM hingegen nach jedem Schritt getrocknet (Aizawa *et al.*, 2006). Dieses System eignet sich somit nicht für den Einsatz bei einer *Point-of-care*-Diagnostik.

Die Kopplung der Antikörperfragmente an die Goldoberfläche der QCM bei dem hier eingesetzten System kann entweder direkt (Vikholm-Lundin & Albers, 2006) oder durch die Bildung einer selbstorganisierenden Molekularschicht (engl.: *self assembling monolayer*, SAM) mit Hilfe verschiedener Linker erfolgen (Michalzik *et al.*, 2005a; Aizawa *et al.*, 2006; Al-Halabi, 2008). Durch die direkte Abhängigkeit der QCM-Resonanzfrequenz von der Dicke des Quarzes resultiert die Massenänderung durch Bindung von CRP an den immobilisierten Nachweisantikörper in einer messbaren Frequenzverschiebung des Quarzsensors. Mit Hilfe einer Kalibrierung wird somit eine Konzentrationsbestimmung ermöglicht (Kurosawa *et al.*, 2003b). Das beschriebene *Lab-on-a-chip*-System sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Regenerierbarkeit, Spezifität und Sensibilität weiterentwickelt und getestet werden.

Der duale Aufbau des Messsystems aus einer Anreicherungs- und Detektionszelle erfordert den Einsatz von mindestens zwei sich in mehreren biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheidenden CRP-spezifischen Antikörpern. Dabei wird ein Antikörperfragment benötigt, welches das native CRP sehr spezifisch aus dem Proteingemisch des Blutserums isoliert. Nach Entfernen der anderen Serumproteine durch Waschen, kann das CRP von diesem Antikörperfragment eluiert werden. Das in dem Elutionspuffer befindliche unter Umständen partiell denaturierte CRP soll dann von dem an die Goldoberfläche der QCM immobilisierten zweiten Antikörperfragment erkannt werden. Dabei liegt die Herausforderung darin, dass das ggf. denaturiert vorliegende CRP unter den physikochemischen Eigenschaften des Elutionspuffers der Anreicherungszelle spezifisch gebunden wird. Zusätzlich muss eine hohe Regenerierbarkeit des Systems gegeben sein, um eine Vielzahl von Messzyklen durchführen zu können.

Auf dieser Grundlage aufbauend wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Strategien angewandt, um Antikörperfragmente mit unterschiedlichen proteinbiochemischen Eigenschaften zu generieren. Zum einen wurden bereits vorhandene CRP-spezifische scFv-Fragmente (Al-Halabi, 2008) zur Steigerung der Produktionsrate und der Stabilität in andere Formate überführt. Zum anderen wurden diese Fragmente mutagenisiert, um Antikörperfragmente mit veränderten Eigenschaften zu erzeugen. Zudem sollten mit Hilfe der Phagen-Display-Methode weitere Selektionen unter veränderten Bedingungen erfolgen. So sollten die Eigenschaften der isolierten Antikörperfragmente gezielt beeinflusst werden,

sodass sie den Anforderungen für einen Einsatz im beschriebenen *Lab-on-a-Chip*-System entsprechen. In einem weiteren Schritt wurde die Bindung der Antikörperfragmente an Goldoberflächen weiter optimiert.

V.1 FUSION VON SCFV-ANTIKÖRPERFRAGMENTEN AN C_k/C_λ

Durch die vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten von scFv-Fragmenten haben sich diese zu einem interessanten Forschungsobjekt und zu den am meisten verwendeten Antikörperfragmenten entwickelt (Blazek & Celer, 2003). Da die Produktion von scFv-Fragmenten in *E. coli* eine kostengünstige Alternative zur Produktion von vollständigen IgG-Molekülen in eukaryotischen Zellen darstellt (Derewenda, 2004), die Ausbeuten hierbei jedoch häufig nur sehr gering sind, werden stets Prozessoptimierungen (Donovan *et al.*, 1996) oder gezielte Veränderungen der scFv-Fragmente durchgeführt, die höhere Ausbeuten versprechen (Hayhurst, 2000).

Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Fusion der konstanten Domäne der leichten Kette Kappa (C_k) oder Lambda (C_λ) an den C-Terminus von scFv-Fragmenten. Auf diese Weise konnte bereits die Produktion von scFv-Fragmenten *in vitro* mit zellfreiem *E.-coli*-S30-Zelllysate (Palmer *et al.*, 2006) und in Insektenzellen (Reavy *et al.*, 2000) erheblich gesteigert werden. Möglicherweise wird durch die Fusion an $C_{k/\lambda}$ die wachsende Polypeptidkette während der Synthese stabilisiert, die Faltung verbessert oder das Fusionsprotein besser vor Degradation geschützt (Palmer *et al.*, 2006). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde nun in dieser Arbeit überprüft, ob die Fusion von $C_{k/\lambda}$ an die bereits vorhandenen CRP-Binder LA13-IIE3-scFv und TOB5-D4-scFv (Al-Halabi, 2008) einen Einfluss auf die Produktion in *E. coli* und die Aktivität der Antikörperfragmente hat. Dabei wurde für die Fusionsproteine eine Steigerung der Produktion gegenüber den korrespondierenden scFv-Fragmenten mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Da allerdings nur die Gesamtproteinfraktion untersucht wurde, konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, ob sich die scAb im Cytoplasma oder im Periplasma befanden. Somit besteht die Möglichkeit, dass zwar eine größere Proteinmenge produziert wurde, die gebildeten scAb-Fragmente jedoch als nicht verwertbare *inclusion bodies* vorlagen (Hartley & Kane, 1988). Die anschließende Überprüfung der Aktivität gereinigter Antikörperfragmente mittels ELISA zeigte jedoch eine verringerte CRP-Bindung der scAb-Fragmente gegenüber der korrespondierenden scFv-Fragmente. Da identische Mengen an scAb- und scFv-Fragmenten eingesetzt wurden, kann der signifikante Aktivitätsverlust evtl. auf instabile, nicht korrekt gefaltete scAb-Fragmente zurückgeführt werden (Kipriyanov *et al.*, 1997). Ein Grund hierfür könnte in der Konstruktion der C_k - und C_λ -Expressionsvektoren liegen. Diese wurden im

Gegensatz zu denen in den voran genannten Arbeiten so konstruiert, dass das C-terminale Cystein deletiert wurde, wodurch eine Dimerisierung zweier scAb-Fragmente über den konstanten Teil und eine ggf. damit einhergehende Stabilisierung des bivalenten Gesamtfragments erschwert bzw. verhindert wurde. Somit könnte die Fusion an die konstanten Domäne C_{κ} und C_{λ} zur Expression von weniger stabilen monovalenten Antikörperfragmenten führen. Die Aktivität der weniger stabilen Einzelmoleküle kann durch sterische Hinderung der Antigenbindestelle z. B. durch „Umkappen“ und Anlagerung der schweren Kette (V_H) an den konstanten Teil beeinflusst werden. In jedem Fall könnte die in den voran genannten Arbeiten beschriebenen höheren Aktivitäten der scAb-Fragmente auf Aviditätseffekte der bivalenten Dimere zurückzuführen sein, die in dieser Arbeit durch eine entsprechende Konstruktion der Expressionsvektoren gezielt verhindert wurde. Außerdem könnte die verstärkte Produktion bei den scAb-Fragmenten einen toxischen Einfluss auf die produzierenden *E.-coli*-Zellen haben, der auf eine Überlastung des Sekretionsapparats für den Transport der Antikörperfragmente ins Periplasma zurückzuführen ist (Levy *et al.*, 2007). Aufgrund der beschriebenen Probleme scheint *E. coli* nur bedingt für eine Produktion von scAb-Fragmenten geeignet. Abhilfe könnten die zuvor beschriebenen alternativen Expressionssysteme (S30-Zelllysate, Insektenzellen) schaffen. Auch könnten die negativen Effekte einer erhöhten scAb-Produktion auf *E. coli* (Toxizität, geringere Aktivität der Fragmente) durch eine „künstlich“ herbeigeführte Reduzierung der Expression z. B. mit geringeren IPTG-Konzentrationen erreicht werden (McGregor *et al.*, 1994). Durch Änderung und Variation der TIR (engl.: *translation initiation region*), welche das Initiator-Codon, die Shine-Dalgarno-(SD-)Sequenz und translationale *Enhancer* umfasst (Simmons & Yansura, 1996), konnte die Produktion von vollständigen IgG-Molekülen in *E. coli* realisiert werden (Simmons *et al.*, 2002). Hierdurch könnten zwar korrekt gefaltete und damit aktive scAb-Fragmente produziert werden, jedoch stünden diese Maßnahmen im Gegensatz zu der erwünschten Steigerung der Produktion.

V.2 NEUE SELEKTIONEN UNTER VERÄNDERTEN RAHMENBEDINGUNGEN

Da für die Anreicherungs- und Detektionszelle mindestens zwei verschiedene Antikörperfragmente benötigt werden, die unterschiedliche Anforderungen erfüllen müssen, wurden mit Hilfe weitere Selektionen weitere Antikörperfragmente isoliert, die *per se* andere biochemische Eigenschaften aufwiesen als die bereits vorhandenen scFv-Fragmente LA13-IIIE3 und TOB5-D4 (Al-Halabi, 2008). Hierfür wurde die Phagen-Display-Technologie unter Verwendung der zwei naiven humanen Antikörpergenbibliotheken HAL7 und HAL8 (Hust *et al.*, 2011), die Ketten des Lambda- (VL1-VL10) und des Kappa-Typs (VK1, VK3 und VK4) enthalten,

verwendet. Außerdem kamen die beiden semi-synthetischen Antikörpergenbibliotheken Tomlinson I und J, bei deren Konstruktion ausschließlich leichte Ketten des Kappa-Typs verwendet wurden, zum Einsatz. Des Weiteren basieren diese beiden Bibliotheken auf je einer einzelnen humanen *Framework*-Region der V_H ($V\gamma$ -23/DP-47 und J_H 4b) und der V_K (O12/O2/DPK9 und J_K 1) (Goletz *et al.*, 2002). Zuvor konnten bereits CRP-spezifische scFv-Fragmente aus Phagen-Display-Bibliotheken isoliert werden, die aus mit humanem CRP immunisierten Vögeln oder Schafen generiert wurden (Leonard *et al.*, 2007; McBride & Cooper, 2008). Im Gegensatz zu bisherigen Pannings wurde das Antigen CRP dabei an die Oberfläche von magnetischen Carboxy-*Beads* anstatt an die Kavitäten einer Polystyrol-MTP immobilisiert. Der größte Vorteil von an magnetischen *Beads* immobilisiertem Antigen ist dabei die Präsentation unterschiedlicher Epitope und die Erhaltung der Konformation des nativen Antigen-Moleküls. Im Gegensatz dazu kann die Immobilisierung an Polystyrol-MTP zum Zerfall des CRP-Pentamers in seine fünf Protomere sowie zur Ausbildung weiterer molekularer Konformationen von CRP (Neo-CRP) führen. Das Neo-CRP zeichnet sich durch Präsentation von Neoantigenen, d. h. Antigenstrukturen, die auf dem nativen Molekül nicht vorhanden sind, aus (Potempa *et al.*, 1987; Ying *et al.*, 1989). Außerdem wurde nachgewiesen, dass scFv-Fragmente, die aus einem Panning mit an festen Oberflächen immobilisiertem Antigen isoliert wurden, überwiegend lineare Epitope erkennen. ScFv-Fragmente, die hingegen aus einem Panning mit an *Beads* gekoppeltem Antigen isoliert wurden, waren auch in der Lage, konformationelle Epitope zu erkennen (Schütte *et al.*, 2009). Weitere Vorzüge sind die freie Beweglichkeit der an die *Beads* gekoppelten Antigene und die durch Bindung mehrerer Antigen-Moleküle pro *Bead* resultierende Oberflächenvergrößerung, die zu einer Erhöhung der Selektions-Effizienz führen kann (Beghetto *et al.*, 2001). Zudem kann somit einem weiteren Nachteil der Immobilisierung auf festen Oberflächen begegnet werden. Hierbei handelt es sich um die bevorzugte Selektion von dimerisierten scFv-Fragmenten, wodurch es zu unerwünschten Aviditäts-Effekten kommt (Schier *et al.*, 1996). Gerade für das in dieser Arbeit untersuchte *Lab-on-a-chip*-System sind die Vorteile der Kopplung des Antigens an magnetische Partikel sehr groß, da Antikörperfragmente benötigt werden, die in der Lage sind, frei in Lösung befindliches, natives CRP spezifisch zu binden.

Mit Hilfe der durchgeführten Selektion auf *Beads* konnten aus allen vier eingesetzten Antikörperphagen-Bibliotheken CRP-spezifische Binder isoliert werden, die entweder an MTP oder an *Beads* immobilisiertes Antigen erkannten. *In-situ*-Analysen identifizierten dabei aus der HAL7- und der Tomlinson-J-Bibliothek jeweils zwei und aus der Tomlinson-I-Bibliothek ein neues, sequenzunterschiedliches scFv-Fragment. Aus der HAL8-Bibliothek konnte hingegen nur das bereits bekannte scFv-Fragment TOB5-D4 erneut isoliert werden. Für vier der fünf neuen

Klone konnte zunächst eine CRP-spezifische Bindung im MTP- bzw. *Bead*-ELISA verifiziert werden. Diese vier Kandidaten aus der HAL7-Bibliothek (IsP26-F11 und IsP26-G1) bzw. der Tomlinson-J-Bibliothek (IsP29-C10 und IsP29-H1) wurden nachfolgend genauer biochemisch charakterisiert. Nach Produktion und IMAC-Reinigung konnte in einem Titrations-ELISA mit an MTP-immobilisiertem CRP für die scFv-Fragmente IsP26-F11 und IsP29-H1 keine Bindung an CRP nachgewiesen werden. Jedoch konnte mit Hilfe eines Sandwich-ELISA die Bindung von nativen CRP-Molekülen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erreichte das IsP26-G1-scFv-Fragment die halbmaximale Absorption bei einer um den Faktor 30 geringeren Konzentration (0,8 nM) als das LA13-IIE3-scFv-Fragment (26 nM). Dieses Ergebnis konnte durch Bestimmung der Bindungskinetiken mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) verifiziert werden. Für das IsP26-G1-scFv-Fragment konnte eine Dissoziationskonstante (K_D) von $7,1 \times 10^{-9}$ M ermittelt werden, die um den Faktor 3,5 kleiner als die des Vergleich-scFv-Fragments LA13-IIE3 ($2,4 \times 10^{-8}$ M) war. Letztere unterscheidet sich nur geringfügig von dem bereits durch Al-Halabi (2008) bestimmten K_D -Wert von $1,11 \times 10^{-8}$ M. Bisher wurden für weitere, aus einer Immun-Bibliothek aus Hühnern isolierte CRP-spezifische scFv-Fragmente, Affinitäten (K_D) im Bereich von $2,54 \times 10^{-8}$ bis $3,53 \times 10^{-10}$ M publiziert (Leonard *et al.*, 2007).

Bei den beiden scFv-Fragmenten IsP26-F11 und IsP29-H1 konnte keine Bindung an CRP nachgewiesen werden, welches an den CM5-Chip immobilisiert vorlag. Mittels Epitopbestimmung konnte für das scFv-Fragment IsP26-G1 nachgewiesen werden, dass dieses lineare Epitope erkennt. Die anderen beiden scFv-Fragmente (IsP26-F11 und IsP29-H1) erkannten demnach nur konformationelle Epitope, die bei der Immobilisierung von CRP an feste Oberflächen (MTP oder CM5-Chip) verloren gehen. Des Weiteren wurden für alle scFv-Fragmente (Ausnahme: IsP26-F11) mittels SEC ausschließlich Monomere nachgewiesen, was ebenfalls auf den Einsatz von magnetischen *Beads* zurückzuführen ist (Schier *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die größere Affinität des IsP26-G1-scFv-Fragments nicht auf einen erhöhten Dimerisierungsgrad und den damit verbundenen apparenten Aviditäts-Effekten beruht.

Mit Hilfe der Selektion unter veränderten Bedingungen wurde auf der einen Seite ein scFv-Fragment (IsP26-G1) mit einer deutlich erhöhten Affinität im Vergleich zu dem bekannten scFv-Fragment LA13-IIE3 identifiziert. Andererseits wurden zwei CRP-Binder isoliert, die in der Lage sind, ein konformationelles Epitop zu erkennen. Diese scFv-Fragmente sind besonders für den Einsatz in der Anreicherungszone des beschriebenen *Lab-on-a-chip*-Systems geeignet, da dort Antikörperfragmente benötigt werden, die in der Lage sind, konformationelle Epitope, wie sie im nativen CRP (Pentamer) vorhanden sind, zu binden. Dabei ist eine weitere biochemische Charakterisierung dieser Fragmente erforderlich: So müsste die Bestimmung von

Bindungskinetiken via SPR unter modifizierten Bedingungen erfolgen, bei denen natives CRP zum Einsatz kommt.

V.3 MUTAGENISIERTE ANTIKÖRPERPHAGEN-BIBLIOTHEKEN

Eine weitere Strategie zur Generierung von Antikörperfragmenten, die bestimmte Eigenschaften wie pH- und Temperaturstabilität, hohe Affinität und Regenerierbarkeit aufweisen und somit die Voraussetzungen für den Einsatz in einem *Lab-on-a-chip*-System erfüllen, ist die Mutagenisierung bereits vorhandener CRP-spezifischer Binder mit anschließender Selektion auf die gewünschten Parameter.

Die zufällige Mutation von Antikörpergensequenzen mittels sequentiellen *Nested-error-prone*-PCR ermöglicht hohe Mutationsraten von bis zu 50 Punktmutationen pro 1000 bp (Graff *et al.*, 2004). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung genetischer Varianten der bereits vorhandenen CRP-spezifischen Antikörperfragmente LA13-IIE3 und TOB5-D4 (Al-Halabi, 2008) eingesetzt. Dabei wurde eine spezielle Mutations-DNA-Polymerase (*Mutazyme II*) verwendet, die *per se* über eine höhere Mutationsrate als herkömmliche DNA-Polymerasen verfügt. Die Antikörpergene der erstellten Bibliotheken „A“ (LA13-IIE3) und „B“ (TOB5-D4) wiesen im Durchschnitt ca. 20 Punktmutationen auf, die über die gesamten für die scFv-Fragmente kodierende Gene hinweg eingefügt wurden. Die erreichte Mutationsrate ist mit der bei der Mutagenisierung von MUC1-spezifischen scFv-Fragmenten vergleichbar (Thie *et al.*, 2011). Durch Einsatz geringere DNA-Matrizen-Mengen könnten die Mutationsraten laut Angaben des Herstellers der *Mutazyme II* DNA-Polymerase weiter erhöht werden. Demnach sind bis zu viermal höhere Mutationsraten von bis zu 16 Punktmutationen pro 1000 bp und PCR möglich. Aufgrund der hohen Zahl von bis zu 6×35 *Error-prone*-PCR-Zyklen zeigten sich negative Auswirkungen auf die Qualität der amplifizierten DNA. Dabei können vor allem an den Enden der DNA-Fragmente Fehler entstehen, die eine anschließende Klonierung erschweren oder zum Einbau unvollständiger scFv-Gene führen. Durch die in dieser Arbeit verwendeten, ineinander geschachtelten (*Nested*-) Primer kann dem entgegenwirkt werden. Dennoch wurde bei der Herstellung der beiden Antikörpergenbibliotheken beobachtet, dass in „A“ 75 % aller mutierten Gene, die für die Antikörperfragmente kodieren, die richtige Länge (*full-length inserts*) aufwiesen, während es in „B“ nur 25 % waren. Im Vergleich dazu enthielt die mutagenisierte Anti-c-*erbB*-2-Bibliothek 95 % *full-length inserts* (Schier & Marks, 1996). Bei den beiden humanen, naiven Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 (Hust *et al.*, 2011) waren es 87 % bzw. 89 % (Michael Hust, persönliche Mitteilung).

Die relativ geringe Qualität der Antikörpergenbibliothek „B“ konnte durch hohe Transformationseffizienzen ($>10^7$ cfu) erfolgreich kompensiert werden. Unter Berücksichtigung

des Anteils der Klone mit *full-length inserts* lagen die theoretischen Komplexitäten bei $6,7 \times 10^6$ („A“) bzw. $9,8 \times 10^6$ („B“) unabhängigen Klonen. Damit waren sie im Vergleich zu den Komplexitäten anderer Bibliotheken, die für die Affinitätsreifung eines anti-c-*erbB*-2-scFv-Fragments ($1,0 - 2,0 \times 10^6$), eines anti-Digoxin-scFv-Fragments ($0,1 - 1,4 \times 10^5$) und zweier anti-*carcinoembryonic-antigen* (CEA)-scFv-Fragment ($1,0 \times 10^6$) bzw. ($2,5 \times 10^6$) bisher beschrieben wurden (Schier *et al.*, 1996; Daugherty *et al.*, 2000; Graff *et al.*, 2004; Pavoni *et al.*, 2006), mindestens um den Faktor 2,5 erhöht.

Für ein (statistisch betrachtet) monovalentes Display wurden die Antikörpergenbibliotheken mit Hilfe des Phagens M13K07 verpackt (Chasteen *et al.*, 2006) und deren CRP-spezifische Bindung nachgewiesen. Mittels Phagen-Display (Smith, 1985) wurden aus den beiden Antikörperphagen-Bibliotheken „A“ und „B“ CRP-spezifische Antikörperfragmente selektiert und amplifiziert. Es konnten insgesamt 13 („A“) bzw. zehn („B“) Sequenz-unterschiedliche Klone identifiziert werden, die durchschnittlich 12,6 („A“) bzw. 13,6 („B“) Punktmutationen aufwiesen. Zeigten vor der Verpackung mit dem Helferphagen M13K07 noch neun der zehn untersuchten Klone kein vollständiges, funktionsfähiges scFv-Fragment, wiesen nach dem Panning alle untersuchten Klone ein solches auf. Somit werden durch das Panning funktionslose Klone eliminiert, was sich auch in der um ca. 35 % verringerten Anzahl der ermittelten Punktmutationen widerspiegelt.

Die Punktmutationen in den Genen der funktionsfähigen scFv-Fragmente waren über den gesamten Genbereich verteilt und führten im Durchschnitt zu 4,5 Aminosäure- (AS-) Austauschen. Drei („A“) bzw. 2,1 („B“) AS-Austausche waren in der V_L -Region lokalisiert, während in der V_H -Region je 1,5 („A“) bzw. 2,4 („B“) Austausche vorlagen. Dabei waren 1,9 („A“) bzw. 1,6 („B“) AS-Austausche direkt in den CDRs lokalisiert. Somit konnten die Ergebnisse der ebenfalls mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie isolierten MUC1-spezifischen scFv-Fragmente bestätigt werden. Hierbei führte die Mutagenisierung mittels *Error-prone*-PCR unter Verwendung einer Mutations-DNA-Polymerase zu einer Affinitätssteigerung um den Faktor 500 und zur Erzeugung von 13 Punktmutationen. Von den resultierenden neun AS-Austauschen waren zwei in der Linkerregion, vier in der V_H und drei in der V_L des scFv-Fragments lokalisiert. Nur insgesamt zwei Mutationen führten dabei zu einer AS-Substitution in den CDRs (Thie *et al.*, 2011). Für die Mutagenisierung mittels *Error-prone*-PCR konnten demnach keine Hotspot-Regionen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu führte ein Austausch von nur drei AS in der CDR der schweren Kette (CDR-H) bei einem durch die Hybridoma-Technologie entwickelten Antikörper gegen das Hapten p-Azophenylarsenat (ARS) zu einer 200fach erhöhten Affinität (Sharon, 1990). Durch Mutagenisierung der CDRs eines α -HIV-Fab-Fragments mittels CDR-Walking konnte eine 96 – 420fache Steigerung der Affinität

100

erreicht werden (Yang *et al.*, 1995). Dabei waren für die Affinitätssteigerung vor allem Mutationen in der neun AS umfassenden Region H97-100 und H100A-E der CDR3-H verantwortlich. Diese Region wurde durch *Chain-Shuffling*-Experimente als eine natürliche Hotspot-Region für somatische Hypermutation identifiziert (Barbas *et al.*, 1993).

Nach Produktion und Verifizierung der spezifischen CRP-Bindung erfolgte aufgrund höherer ELISA-Signale gegenüber dem Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3 die Auswahl von fünf Kandidaten. Das LA13-IIE3-scFv-Fragment sowie die mutagenisierten scFv-Fragmente DF39-A4, DF39-E1, DF39-E11, DF40-B6 und DF40-G11 wurden anschließend weiter biochemisch charakterisiert. So konnte für die Antikörperfragmente DF39-A4, DF39-E1 und DF40-G11 die halbmaximale Absorption bei einer um den Faktor 2 – 3 geringeren scFv-Konzentrationen nachgewiesen werden als bei dem korrespondierenden Ausgangs-scFv-Fragment. Die Mutagenisierung des scFv-Fragments TOB5-D4 führte hingegen nur in einem Fall (IsP8-IIE7) zu vergleichbaren Ergebnissen (Popp, 2011). Mittels SPR wurden für die LA13-IIE3-Derivate bis um den Faktor neun erhöhte Affinitäten ermittelt, was frühere Arbeiten bestätigte, in denen 10 – 14 Punktmutationen zu einer Affinitätssteigerung führten (Daugherty *et al.*, 2000; Thie *et al.*, 2011). Für das scFv-Fragment TOB5-D4 und dessen Derivate konnte keinerlei Bindung an auf einem CM5-Chip immobilisiertem CRP gezeigt werden (Popp, 2011), da diese ausschließlich konformationelle Epitope erkennen, die durch partielle Denaturierung des CRPs verloren gehen. Im Gegensatz dazu zeigten das LA13-IIE3-scFv-Fragment und dessen Derivate sehr starke Bindungen von linearisiertem CRP.

Um mit der bereits etablierten Labor-gebundenen Diagnostik konkurrieren zu können, müssen die Gesamtkosten eines *Lab-on-a-chip*-Systems möglichst gering gehalten werden. Neben den Herstellungskosten für mikrofluidische Sensor-Systeme spielt daher die Wiederverwendbarkeit des Sensorchips eine Schlüsselrolle (Kramer *et al.*, 2002). Zusätzlich ist für den Einsatz in Diagnostik und Therapie die Stabilität der verwendeten Antikörper(fragmente) sehr wichtig (Willuda *et al.*, 1999). Da sich Schutzproteine, Proteaseinhibitoren oder andere stabilisierende Agenzien negativ bei der Kopplung der scFv-Fragmente an die Goldoberfläche des Quarzmikrosensors auswirken können, können diese nicht für die Lagerung von scFv-Fragmenten verwendet werden. Aus diesem Grunde sind besonders stabile Antikörperfragmente vorteilhaft. Die Überprüfung der Stabilität von Antikörperfragmenten kann z. B. mittels Inkubation in (humanem) Serum bei 37 °C, in Guanidin-HCl, durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen oder auch durch kalorimetrische Methoden erfolgen (Worn & Pluckthun, 2001; Park *et al.*, 2003; Honegger, 2008). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedlich aufgebaute Stabilitätstests durchgeführt. Für alle getesteten Kandidaten

konnte eine sehr gute Langzeitstabilität (über 90 % Aktivität nach Inkubation für 14 Tagen bei 37 °C) und Hitzestabilität (Inkubation bei bis zu 66 °C für 30 Minuten ohne nennenswerte Aktivitätsverluste) ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für das TOB5-D4-scFv-Fragment und dessen Derivate gezeigt. Bei einem Langzeitstabilitätstest fiel der Aktivitätsverlust der TOB5-D4-Derivate nach Inkubation für 1 Tag bei 37°C geringer aus als bei dem korrespondierenden Vergleichs-scFv-Fragment. Im Gegensatz zu den LA13-IIE3-Derivaten hatte die Inkubation für 30 Minuten bei Temperaturen bis zu 65°C keinerlei Einfluss auf die CRP-spezifische Aktivität der TOB5-D4-Derivate (Popp, 2011). Demzufolge können die generierten Antikörperfragmente für sehr lange Zeiträume (mindestens zwei Jahre) bei 4 °C gelagert werden. Eine weitere Erhöhung der Stabilität der scFv-Fragmente kann durch zusätzliche gezielte Mutationen (Steipe *et al.*, 1994; Ewert *et al.*, 2003) oder durch DNA-*Shuffling*, bei dem die schwere Kette mit unterschiedlichen leichten Ketten neu kombiniert wird, erreicht werden. Aus den neu generierten Antikörperfragmenten können dann Klone mit erhöhter Stabilität (Marks *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1999; Worn & Pluckthun, 2001; Monsellier & Bedouelle, 2006) oder Affinität (Komissarov *et al.*, 1997; Krykbaev *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007) selektiert werden. Darüber hinaus kann eine weitere Stabilisierung der Antikörperfragmente *in vitro* durch Modifizierung mit PEG (Kim *et al.*, 2007) oder Glykosylierung (Sinclair & Elliott, 2005) erfolgen.

ScFv-Fragmente können aufgrund ihrer Struktur und Aminosäuresequenz dazu tendieren, spontan Dimere und/oder Aggregate auszubilden. Dies geschieht durch „Aufklappen“ der beiden variablen Ketten V_H und V_L, die jedoch weiterhin durch den Peptidlinker verbunden bleiben, und nachfolgender Dimerisierung mit einem weiteren Fragment zu einem sogenannten *Diabody* (Holliger *et al.*, 1993). *Diabodies* und Aggregate können unter Umständen mehr als eine Bindestelle besitzen und dadurch einen Aviditätseffekt hervorrufen. Dieser kann die apparente Affinität zum Teil drastisch verstärken, was bei der Charakterisierung von Antikörperfragmenten dazu führen kann, dass vermeintlich monovalente scFv-Fragmente aufgrund einer starken Tendenz zur Dimerbildung verbesserte Bindungseigenschaften aufweisen.

Mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde für die Kandidaten DF39-A4 und DF40-G11 im Vergleich zum LA13-IIE3-scFv-Fragment ein deutlich erhöhter Dimerisierungsgrad gezeigt. Die erhöhten Affinitäten dieser beiden scFv-Fragmente sind demzufolge zum Teil auf Aviditätseffekte zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wiesen die scFv-Fragmente DF39-E1, DF39-E11 und DF40-B6 im Vergleich zum LA13-IIE3 eine leicht verringerte Tendenz zur Dimerisierung auf, wodurch ein Aviditätseffekt hier ausgeschlossen werden kann. Im Vergleich

dazu, wiesen sämtliche TOB5-D4-Derivate eine signifikante Verringerung der Tendenz zur Multimerisierung auf (Popp, 2011).

Somit konnte die für das Panning mit immobilisiertem Antigen beschriebene erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Anreicherung von Antikörperfragmenten mit verstärkter Aggregationsneigung (Johnson & Hawkins, 1996; Schier *et al.*, 1996) für zwei (DF39-A4 und DF40-G11) Antikörper bestätigt werden. Die mutagenisierten Antikörperfragmente unterscheiden sich voneinander nur in Ihrer AS-Sequenz, was demzufolge die Ursache für das unterschiedliche Aggregationsverhalten darstellt. Dadurch wird gezeigt, dass durch nur wenige Änderungen der AS-Sequenz die Eigenschaften von Antikörperfragmenten (Affinität, Stabilität, Produzierbarkeit, Toxizität, Immunogenität und Dimerisierungsneigung) stark beeinflusst werden (Foote & Winter, 1992; Ito *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2004; diese Arbeit).

Mit Hilfe dieser Selektionsmethode wurden scFv-Fragmente mit teilweise erhöhten Affinitäten (z. B. DF39-E1-scFv: Faktor neun) im Vergleich zu den Ausgangsfragmenten LA13-IIE3 und TOB5-D4 bei gleichzeitig deutlich verringerter Tendenz zur Dimerisierung isoliert. Im Vergleich zu bisherigen Arbeiten, bei denen die Affinität mittels Mutagenisierung um den Faktor 200 (Sharon, 1990) bzw. 500 (Thie *et al.*, 2011) gesteigert wurde, fällt die in dieser Arbeit erreichte Affinitätssteigerung relativ gering aus. Dies kann auf die unterschiedlich hohen Affinitäten ($4,24 \times 10^{-6}$ M, $3,1 \times 10^{-7}$ M bzw. $2,4 \times 10^{-8}$ M) der Ausgangsfragmente anti-ARS 36-65 (Sharon, 1990), anti-Muc1 IIB6 (Thie *et al.*, 2011) und anti-CRP LA13-IIE3 (diese Arbeit) zurückgeführt werden. Berücksichtigt man die Ergebnisse der SEC, so beruht die Affinität bzw. das Bindungsverhalten des hier verwendeten Ausgangs-scFv-Fragments LA13-IIE3 zu einem nicht unerheblichen Teil auf Aviditätseffekten. Für das *Lab-on-a-chip*-System werden hoch affine Binder benötigt, um einerseits eine sehr spezifische Anreicherung des CRPs in der Anreicherungszone zu ermöglichen und andererseits eine hohe Sensitivität des Sensors zu gewährleisten (Nachweis geringer CRP-Konzentrationen). Daher ist für die Auswahl dieser Binder eine Reduzierung des Dimerisierungsgrads vorteilhaft, um monovalente Antikörperfragmente miteinander vergleichen zu können. Außerdem liegt bei unterschiedlichen Produktionschargen keine definierte, gleichbleibende Menge an Dimeren vor, wodurch eine Quantifizierung erschwert wird. Dies ist besonders für die zur Charakterisierung des beschriebenen *Lab-on-a-chip*-Systems benötigte Selektion von hoch affinen monovalenten Bindern relevant.

Für den Einsatz auf dem *Lab-on-a-chip*-System werden extrem stabile (häufige Messzyklen) und hoch affine (möglichst hohe Sensitivität des Messsystems) Antikörperfragmente benötigt. Dies kann unter anderem durch Überführung der identifizierten scFv-Fragmente in ein

bivalentes Antikörperformat erreicht werden. Bei scFv-Fc-Antikörpern werden zwei scFv-Fragmente direkt an die *Hinge*-Region eines humanen IgG1-Fc-Teils gekoppelt (Kenanova & Wu, 2006). Mittels Titrations-ELISA und SPR-Analysen konnte für alle gereinigten scFv-hIgG1-Fc-Fusionen erhöhte Affinitäten im Vergleich zu den korrespondierenden scFv-Fragmenten gezeigt werden. Hierfür ist die Bivalenz der scFv-Fc-Antikörper verantwortlich (Janeway *et al.*, 2009). Bis auf eine Ausnahme (DF40-G11) waren allerdings hierbei die z.T. deutlichen Affinitätsunterschiede zwischen den mutagenisierten Antikörperfragmenten und dem Ausgangs-Fragment nicht mehr erkennbar. Die Derivate zeigten im Wesentlichen die gleichen Bindungseigenschaften wie der LA13-IIE3 und nur zum Teil erhöhte (Faktor 2 – 4) Affinitäten. Im Gegensatz führte die Überführung in ein bivalentes Antikörperformat bei den TOB5-D4-Derivaten nur bei einem Kandidaten (IsP8-IC11) zu einer minimalen (Faktor 1,8) Erhöhung der Affinität, wohingegen der zweite Kandidat (IsP8-IIE7) eine identische Affinität wie das Ausgangsfragment TOB5-D4 ($6,6 \times 10^{-9}$) aufwies (Popp, 2011). Die Überführung in ein bivalentes Antikörperformat führte also wie erwartet nicht zu einer Verstärkung der Affinitätsunterschiede zwischen den mutagenisierten und dem Ausgangs-Antikörperfragmenten sondern zu einer Angleichung.

V.4 VERBESSERUNG DER CRP-DETEKTION DURCH GERICHTETE IMMOBILISIERUNG VON ANTIKÖRPERFRAGMENTEN MITTELS SNAP-TAG

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Sensibilität des *Lab-on-a-Chip*-Systems ist eine effiziente gerichtete Immobilisierung der CRP-spezifischen Antikörperfragmente auf der Goldoberfläche der QCM. Bisher wurden die scFv-Fragmente entweder direkt mittels Chemisorption über ein C-terminales Cystein, das über eine zusätzliche, freie, gut zugängliche Thiolgruppe verfügt (Vikholm-Lundin & Albers, 2006) oder über freie Aminogruppen eines zuvor gekoppelten SAMs gebunden. Dabei handelt es sich um langkettige funktionalisierte Alkanthiole, die ebenfalls mittels Chemisorption an die Goldoberfläche gebunden werden. Neben den bisher verwendeten SAM, bestehend aus Cystamin und Glutardialdehyd (Michalzik *et al.*, 2005a; Balck *et al.*, 2011), können weitere Linker wie Mercaptoundecansäure (Jiang *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005; Aizawa *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2008) oder Dithiobis-(succinimidylpropionat) (DSP) (Storri *et al.*, 1998; Hengerer *et al.*, 1999) verwendet werden. Bei dem erstgenannten verblieb der höchste Anteil der Antikörperfragmente funktional (Al-Halabi, 2008).

Bei allen genannten Methoden erfolgt dieser Vorgang nicht gerichtet. Es kann möglich sein, dass ein nicht beeinflussbar großer Anteil an scFv-Fragmenten so an den Chip gebunden wird, dass die CRP-spezifischen Antigenbindestellen teilweise oder ganz maskiert werden. Dadurch

sinken die Effizienz der Antigen-Bindung und damit die Sensibilität des Messsystems. Um diesen Umstand entgegen zu wirken und eine gerichtete Immobilisierung auf dem Gold-Chip zu ermöglichen, wurden CRP-spezifische Antikörperfragmente modifiziert und mit dem SNAP-Tag fusioniert. Die erstellten scFv-SNAP-Fusionsproteine können somit ohne Beeinträchtigung der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums (Kindermann *et al.*, 2003) kontrolliert an feste Oberflächen, wie beispielsweise mit Dextran beschichtete CM5-Chips, immobilisiert werden (Kampmeier *et al.*, 2009), wodurch Messungen mittels SPR ermöglicht werden (Huber *et al.*, 2004; Engin *et al.*, 2010). Hierfür wurden die nach Auswertung aller bisherigen Versuche aussichtsreichsten Kandidaten DF39-E1 und DF40-G11 aufgrund ihrer erhöhten Affinität und Stabilität sowie das Ausgangs-scFv-Fragment LA13-IIE3 ausgewählt und entsprechende scFv-SNAP-Fusionsproteine erstellt. Die mit Hilfe einer Expressionsanalyse ermittelten optimalen Expressionsbedingungen wurden bei der Produktion im LEX®-Bioreaktor berücksichtigt. Bei der anschließenden IMAC-Reinigung konnten jedoch nur geringe Mengen an scFv-SNAP-Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Dabei lagen die Fusionsproteine z. T. stark degradiert vor, was auf den mitunter erhöhten proteolytischen Abbau im Periplasma zurückgeführt werden kann (Wulfig & Pluckthun, 1994; Missiakas & Raina, 1997). Offensichtlich müssen weitere Optimierungen erfolgen, um nach einem *Up-scaling* scFv-SNAP-Fusionsproteine in ausreichend hoher Quantität und Qualität produzieren zu können. Ein Flaschenhals könnte dabei die Produktion in *E. coli* darstellen. Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen, bei denen die korrekte Faltung beider Teile des Fusionsproteins im Cytoplasma von *E. coli* beschrieben wurde (Kindermann *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2004; Kufer *et al.*, 2005), muss der Antigen-spezifische scFv-Teil in das Periplasma sekretiert werden, da nur dort das für die korrekte Faltung notwendige oxidierende biochemische Milieu vorliegt (Better *et al.*, 1988; Skerra & Pluckthun, 1988). Dem gegenüber steht der SNAP-Tag, der als DNA-bindendes Protein im Cytoplasma korrekt gefaltet wird, aber unter den im Periplasma herrschenden Bedingungen ggf. falsch gefaltet werden kann. Möglicherweise wird ein ohnehin limitierender Faktor, die Translokation des Fusionsproteins in das Periplasma (Hockney, 1994; Makrides, 1996), durch den SNAP-Tag verstärkt. Diesem Problem könnte mit Hilfe von eukaryotischen Expressionssystemen begegnet werden, mit denen bereits die Produktion von *human estrogen receptor α* (hER α)-SNAP-Fusionen in HeLa-MR-Zellen gezeigt wurde (Keppler *et al.*, 2004). Für die Etablierung einer Methode zur ortsspezifischen Markierung von Antikörperfragmenten wurden sogar verschiedene (CD25-, CD30- und CD64-spezifische) scFv-SNAP-Fusionen erfolgreich in HEK293T- und CHO-Zellen produziert (Kampmeier *et al.*, 2009).

Für alle gereinigten Fusionsproteine wurde mittels Titrations-ELISA eine CRP-spezifische Bindung nachgewiesen. Die Aktivität des SNAP-Tags wurde exemplarisch bei der LA13-IIE3-

SNAP-Fusion bestätigt. Des Weiteren wurde das LA13-IIE3-SNAP-Fusionsprotein an die zuvor mittels *SNAP CBG-NH₂* beschichtete CM5-Chip-Oberfläche gerichtet immobilisiert und anschließend eine Konzentrationsabhängige CRP-spezifische Bindung nachgewiesen. Allerdings wurde das gebundene CRP schlagartig beim Waschen mit Laufpuffer entfernt, womit ähnliche Effekte bei der QCM-Messung bestätigt wurden. Im Gegensatz dazu konnte denaturiertes CRP zwar gebunden, jedoch auch durch Regeneration mit 25 mM HCl (pH 1,6) nicht wieder entfernt werden. Aufgrund dieser Tatsache, der Kinetik sowie dem Bindungsverlauf kann auf eine unspezifische, „klebrige“ Bindung des CRPs an die Chip-Oberfläche geschlossen werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine CRP-spezifische Bindung mittels SNAP-Tag immobilisierter Antikörperfragmente im BIAcore2000TM-System gezeigt werden. Eine Optimierung der Produktion und Reinigung der scFv-SNAP-Fusionen ist für eine weitere Charakterisierung ebenso notwendig wie für eine Reduktion der Gesamtkosten des *Lab-on-a-chip*-Systems. Da dieses möglichst kostengünstig mehrfache Messungen von CRP ermöglichen soll, sind geringe Antikörperfragment-Produktionskosten erwünscht. Aufgrund der sehr einfachen und kostengünstigen Handhabung (geringe Medienkosten, vergleichsweise kurze Kultivierungszeiten) ist eine Produktion von scFv-SNAP-Fusionsproteinen in *E. coli* gegenüber der Produktion in eukaryotischen Expressionssystem erstrebenswert. Letztere zeichnen sich allerdings durch höheren Ausbeuten und geringeren Aufarbeitungskosten (Sekretion der heterologen Proteine ins Kulturmedium) im Vergleich zu *E. coli* aus.

V.5 CHARAKTERISIERUNG UND EVALUIERUNG DES QUARZKRISTALLMIKROWAAGEN-SENSORS MIT HILFE VERSCHIEDENER ANTIKÖRPERFRAGMENTE

Zur Charakterisierung des *Lab-on-a-chip*-Systems wurden Messungen mit verschiedenen Antigen-spezifischen QCM-Sensoren durchgeführt.

Zunächst wurde das bisher bekannte Antikörperfragment LA13-IIE3 sowie die nach dem Vergleich verschiedener Antikörperfragmente und nach Evaluierung aller bisherigen Analysen besten Kandidaten DF39-E1 und DF40-G11 zur Detektion von CRP aus einer Lösung verwendet. Dabei wurde in mehreren Messzyklen ein konzentrationsabhängiges, CRP-spezifisches Signal gemessen. Für die scFv-Fragmente DF39-E1 und DF40-G11 zeigte sich im Vergleich zum LA13-IIE3-scFv-Fragment eine schnellere Abnahme der absoluten Frequenzunterschiede, was eine deutliche Auswirkung auf die Anzahl der möglichen Messzyklen (DF39-E1: 10 bzw. LA13-IIE3: 50) hatte. Die Nachweisgrenze betrug dabei 250 µg/mL (LA13-IIE3 und DF39-E1) bzw. 500 µg/mL (DF40-G11) CRP. Wurden hingegen das TOB5-D4-scFv-Fragment bzw. sein mutagenisiertes Derivat IsP8-IIE7-scFv auf der Chipoberfläche immobilisiert, wurden deutlich geringere CRP-Konzentrationen (25 µg/mL) nachgewiesen.

Die Sensitivität des Messsystems reicht damit aus, um bakterielle Infektionen nachzuweisen (Kushner, 2001). Sie ist jedoch für die Untersuchung physiologischer CRP-Werte gesunder Menschen von ca. 1 µg/mL (Shine *et al.*, 1981) oder für die Betrachtung des Verlaufs von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Koenig *et al.*, 1999) noch unzureichend. Dies wird im Vergleich zu anderen Arbeiten, bei denen QCMs bereits erfolgreich als DNA-Biosensor für die Detektion von α -thalassemia 1 (SEA-Deletion) (Chomean *et al.*, 2010), von Fisch-pathogenen Viren (Hong *et al.*, 2010) und zur Genotypisierung von *Plasmodium falciparum* (Potipitak *et al.*, 2011) eingesetzt wurde, deutlich. Bei diesen Arbeiten liegen die Nachweisgrenzen der kommerziell erhältlichen QCM-Sensoren bei sehr geringen DNA- bzw. Analyt-Konzentrationen von 25 µg/mL (Chomean *et al.*, 2010), 25 ng/mL (Carrigan *et al.*, 2005) sowie 25 pg/mL (Potipitak *et al.*, 2011) und führen zu messbaren Frequenzunterschieden. Abhilfe könnte der Einsatz einer dem QCM-Sensor vorgeschalteten Anreicherungszone schaffen. Zudem könnte durch weitere Optimierungen der in dieser Arbeit eingesetzten QCM-Chips eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden.

Die mutagenisierten Derivate (DF39-E1, DF40-G11 und IsP8-IIE7) waren in Bezug auf biochemische Eigenschaften wie Affinität und Stabilität im Vergleich zu den Ausgangs-Fragmenten (LA13-IIE3 und TOB5-D4) zum Teil deutlich verbessert. Dennoch fällt auf, dass diese nicht zwangsläufig zu sensitiveren und reproduzierbareren QCM-Messungen führen. Die hier gewählten Parameter Affinität und Stabilität sind somit nur bedingt für eine Vorauswahl potentieller Kandidaten geeignet. In jedem Fall müssen die entsprechenden Antikörperfragmente im Endsystem getestet und evaluiert werden. So könnte nun vermutet werden, dass z. B. mutagenisierte Fragmente mit unveränderten biochemischen Eigenschaften dennoch zu Verbesserungen bei den QCM-Messungen führen.

Dass das TOB5-D4-scFv-Fragment dem LA13-IIE3-scFv-Fragment trotz vermeintlich schlechterer CRP-Bindungeigenschaften bei den QCM-Messungen sowohl in Sensitivität, Regenerierbarkeit als auch Reproduzierbarkeit deutlich überlegen ist, könnte an den unterschiedlichen Epitopen beider Antikörperfragmente liegen. Das LA13-IIE3-scFv-Fragment und seine Derivate erkennen lineare Epitope, die bei partiell denaturiertem Neo-CRP, wie es z. B. durch Immobilisierung an die Oberfläche einer MTP der Fall ist, exponiert vorliegen und daher leicht zugänglich sind (Potempa *et al.*, 1987). Dies ist auf die gewählte Panning-Strategie mit Selektion auf an MTP immobilisiertem CRP, das vermutlich teilweise denaturiert vorlag, zurückzuführen (Al-Halabi, 2008). Da das Epitop des LA13-IIE3-scFv-Fragments außerdem nahe der inneren Pore des CRP-Moleküls lokalisiert ist, wo es eine α -Helix ausbildet (Al-Halabi, 2008), kann es bei Verwendung von nativem CRP durch die Tertiärstruktur des einzelnen CRP-Protomers oder durch die Anordnung im Pentamer teilweise oder ganz verdeckt sein. Diese

Antikörperfragmente scheinen also mit einer deutlich geringeren Affinität (etwa um den Faktor 10 – 100) an natives im Vergleich zu partiell denaturiertem CRP zu binden. Folglich könnte sich ein Gleichgewicht zwischen nur einigen wenigen an scFv-Fragmenten gebundenen CRP-Molekülen und frei in Lösung befindlichem CRP einstellen, solange das Protein in der zu analysierenden Lösung vorhanden ist. Sobald kein CRP mehr vorhanden ist, verschiebt sich das Gleichgewicht vollständig in Richtung des ungebundenen Zustands. Durch diese unzureichende bzw. nicht-stabile Bindung des nativen, in Lösung befindlichen CRPs könnten sowohl die geringe Sensitivität des Systems als auch die rasche Elution des CRPs durch Laufpuffer erklärt werden. Im Gegensatz dazu erkennen das TOB5-D4-scFv-Fragment und seine Derivate konformationelle Epitope, wodurch eine Bindung von nativen CRP-Molekülen erleichtert wird. Auch unter den *Steady-state*-Bedingungen eines *Sandwich*-ELISAs wurde hier für die hier verwendeten scFv-Fragmente LA13-IIE3, DF39-E1 und DF40-G11 keine Bindung von frei in Lösung befindlichem nativem CRP gezeigt. Diese steht jedoch im Widerspruch zu bisherigen Ergebnissen, bei denen eine Bindung von nativem CRP durch das LA13-IIE3-scFv-Fragment gezeigt wurde (Al-Halabi, 2008). Im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten CRP, das aus dem Blut erkrankter Patienten angereichert wurde, handelte es sich bei dem der vorherigen Arbeit (Al-Halabi, 2008) um humanes rekombinant hergestelltes CRP. Wurden in dem *Sandwich*-ELISA hingegen die scFv-Fragmente TOB5-D4 und IsP8-IIE7 eingesetzt, konnte ein entsprechender Nachweis erfolgen.

Somit könnten sowohl die höhere Sensitivität (25 µg/mL) als auch größere Dissoziationszeiten (8 – 12 Minuten) des TOB5-D4 im Vergleich zum LA13-IIE3-scFv-Fragment und dessen Derivaten (250 µg/mL und 5 – 8 Minuten) erklärt werden. Die scFv-Fragmente LA13-IIE3, DF39-E1 und DF40-G11 sind demnach lediglich für den Nachweis von linearisiertem, partiell denaturiertem CRP anwendbar, nicht jedoch, um natives CRP in der Affinitätszelle anzureichern. Trotzdem kommen sie für den Einsatz auf dem Sensorchip, wenn das zu bestimmende CRP nach Elution von der Anreicherungszelle nicht in nativer sondern in denaturierter Form vorliegt, in Frage. Dies muss mit weiteren QCM-Messungen getestet werden.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe eines Pannings auf *Beads* isolierten konformationellen Binder IsP26-F11 und IsP29-H1, die im *Sandwich*-ELISA die besten Ergebnisse erzielten und somit für die Detektion von nativem CRP sehr gut geeignet schienen, wurden ebenfalls für QCM-Messungen verwendet. Da keines der Fragmente an die Chipoberfläche immobilisiert werden konnte, müsste an dieser Stelle eine weitere Optimierung der Kopplung erfolgen. Eine Möglichkeit der Immobilisierung bietet der SNAP-Tag, der in verschiedenen Arbeiten bereits

zur Kopplung von Antikörper-Fragmenten an die Oberfläche eines CM5-Chips erfolgreich Verwendung fand (Kampmeier *et al.*, 2009; diese Arbeit).

Bei Verwendung der scFv-hlgG1Fc-Fusionen von LA13-IIE3, DF39-E1 und DF40-G11 auf dem QCM-Sensor wurde keine Bindung von CRP nachgewiesen, obwohl deren Aktivität bereits anhand verschiedener Anwendungen (ELISA, SPR) in dieser Arbeit gezeigt wurde. Dieses kann nicht auf die erhöhten Molekülmassen bzw. Größen der Fusionsproteine zurückzuführen sein, da mit dem TOB5-D4-scFv-Fc-Antikörper bereits sensitive und reproduzierbare CRP-Messungen erfolgen konnten. Vielmehr scheint die Ursache hierfür in einer Kombination aus mehreren Gründen (Konstitution, Größe und Epitop des Antigens, Affinität des Antikörperfragments zum Antigen und Entfernung von der Chipoberfläche) zu liegen. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Messsystem nimmt die Übertragung des Signals, also die Bindung des Antigens, mit zunehmender Entfernung von der Chipoberfläche ab (Michalzik, 2008). Je größer das immobilisierte Antikörperfragment ist, desto höher muss das Signal sein, um auf den Chip übertragen und somit als Frequenzänderung (Δf) gemessen werden zu können. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse sein. Da der TOB5-D4 natives CRP deutlich besser binden kann als LA13-IIE3 und dessen Derivate, ist ein Einsatz des entsprechenden scFv-hlgG1Fc-Antikörpers zur CRP-Detektion möglich. Allerdings ist sie dem korrespondierenden scFv-Fragment trotz vorhandener Bivalenz unterlegen. So war die Nachweisgrenze mit 100 $\mu\text{g/mL}$ CRP deutlich niedriger als die des scFv-Fragments (25 $\mu\text{g/mL}$). Ebenso wurden vor allem bei höheren CRP-Konzentrationen um den Faktor 2 geringere absolute Frequenzänderungen gemessen. Jedoch könnten die durch den Fc-Teil zusätzlich vorhandenen freien Aminogruppen dazu führen, dass ein im Vergleich zu scFv-Fragmenten ggf. größerer Anteil an Fc-Molekülen ungerichtet immobilisiert wird. Eine gerichtete Immobilisierung z. B. über Protein A, Protein G oder Anti-Human-IgG (Carrigan *et al.*, 2005) könnte zu einer Verbesserung der CRP-Detektion mittels scFv-Fc-Antikörpern führen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob auch vollständige IgG-Moleküle mit dem hier eingesetzten QCM-System zur Antigen-Detektion verwendet werden können. Dies ist im Besonderen im Vergleich zu einer Vielzahl von QCM-basierten Systemen, bei denen IgG-Moleküle eingesetzt wurden, relevant. Als eine der ersten Anwendungen der QCM wurde die Detektion von antiviralen Antikörpern am Beispiel der Selektion von HIV-spezifischen IgGs demonstriert (Aberl *et al.*, 1998). Weiter wurde die Detektion der Bindung von Antikörper an doppelsträngige DNA (dsDNA), welche mittels poly(L-lysine) auf der Chipoberfläche immobilisiert wurde, gezeigt (Fakhrullin *et al.*, 2007). Für die Etablierung eines Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Immunsensors (Briand *et al.*, 2007) und zur Detektion des Oberflächenproteins

Hemagglutinin (HA) des *Avian Influenza* (AI) H5N1 Virus (Li *et al.*, 2011) wurden außerdem bereits vollständige IgG-Moleküle auf der QCM-Oberfläche immobilisiert.

Da ein kommerziell erhältlicher α -CRP-IgG gar nicht gekoppelt werden konnte und mit einem Weiteren nach erfolgreicher Kopplung keine CRP-Detektion möglich war, wurde mit Hilfe des kommerziellen BSA-spezifischen Antikörpers HSA-11-IgG2a gezeigt, dass ein genereller Einsatz von vollständigen IgG-Molekülen möglich ist. Dabei führten aber nur relativ hohe BSA-Konzentrationen (5 - 50 mg/mL) zu einer messbaren Frequenzänderung. Wird die im Vergleich zum CRP (ca. 120 kDa) geringere Molekülmasse des BSA (66 kDa) berücksichtigt, so könnte geschlossen werden, dass höhere CRP-Konzentrationen (>2,5 mg/mL) ebenfalls zu einer messbaren Frequenzänderung führen würden. Sowohl für den Einsatz als *Lab-on-a-chip*-System zur Untersuchung physiologischer CRP-Werte gesunder Menschen von ca. 1 μ g/mL (Shine *et al.*, 1981) oder des Verlaufs von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Koenig *et al.*, 1999) als auch für den Nachweis bakterieller Infektionen (Kushner, 2001) wäre diese Nachweisgrenze allerdings zu gering. Im Vergleich zur Detektion des Sepsis-Biomarkers rhIL-1ra mittels *Real-Time QCM-D-Immunoassay*, bei dem 1000fach niedrigere Konzentrationen (25 ng/mL) in wiederholten Messungen (20 Zyklen in 10 min) nachgewiesen wurden (Carrigan *et al.*, 2005), wird dies besonders deutlich.

Das hier verwendete QCM-System wurde im Rahmen des SFB578 entwickelt (Michalzik *et al.*, 2005a; Balck *et al.*, 2011). In allen hier beschriebenen Arbeiten kamen allerdings kommerziell erhältliche QCM-Systeme zum Einsatz. Ein möglicher Grund für die beschriebenen Beeinträchtigungen des QCM-Systems könnte in der in dieser Arbeit verwendeten Resonanzfrequenz (20 MHz) der Quarz-Chips begründet sein. Diese ist im Vergleich zu den Resonanzfrequenzen von 5 – 12 MHz der meisten kommerziell erhältlichen QCM-Systeme deutlich höher. Anscheinend hat eine erhöhte Resonanzfrequenz einen negativen Einfluss auf die Sensitivität und maximal messbaren Frequenzunterschiede des QCM-Sensors. Dies widerspricht allerdings den Ergebnissen bisheriger Arbeiten, wonach eine Erhöhung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes theoretisch zu einer Erhöhung der messbaren Frequenzänderung führt (Sauerbrey, 1959). Für Eigenfrequenzen größer als 20 MHz wurde zudem bei vergleichenden Messungen mit einem 20-, 30- und 50-MHz-Sensor in einer newtonschen Flüssigkeit ein geringeres Rausch-zu-Signal-Verhältnis gezeigt (Rabe *et al.*, 2003). Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde für den im Rahmen des SFB 578 entwickelten QCM-Sensor eine Resonanzfrequenz von 20 MHz gewählt (Michalzik, 2008). Vergleichende Analysen in einem Frequenzbereich von 5 bis 20 MHz wurden allerdings mit diesem QCM-Sensor bisher nicht durchgeführt. Dafür müssten die QCM-Chips auf eine entsprechende Dicke geätzt und untersucht werden, wodurch ggf. eine weitere Optimierung und evtl. eine Neugestaltung der

Chips notwendig wäre. So könnten die Frequenzschwankungen über Abdichtung und Immobilisierung des Quarzresonators in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer vermindert werden (Sota *et al.*, 2002), wodurch die Sensitivität des Sensors erhöht würde. Des Weiteren könnte eine Ebnung der relativ rauen Chipoberfläche (Al-Halabi, 2008) ebenfalls zur Abnahme von Frequenzschwankungen und hohen Hintergrundsignalen führen (Theisen *et al.*, 2004).

Abschließend wurde durch den Einsatz einer weiteren Kombination aus Antigen und Antikörperfragment (Lysozym und α -Lysozym-scFv-Fragment D1.3) das in dieser Arbeit verwendete QCM-System weiter untersucht und charakterisiert. Die abhängig von der Antigen-Konzentration gemessenen deutlich höheren Frequenzunterschiede (46 – 890 Hz) im Vergleich zur Kombination aus TOB5-D4 und CRP (23 – 350 Hz) zeigten, dass das Detektionslimit des QCM-Systems noch nicht ausgeschöpft ist. Weiter wurde nachgewiesen, dass die Dissoziationszeiten von 8 – 12 Minuten mit denen des TOB5-D4-scFv-Fragmentes vergleichbar waren. Das rasche Ablösen des Antigens durch Laufpufferfluss war nicht auf die Kombination CRP/ α -CRP-Antikörperfragment beschränkt, sondern trat generell bei dem verwendeten QCM-System. Während die Detektion von CRP aus einem genau definiertem Serum (FCS) fehlschlug, konnte die Anwendbarkeit dieses QCM-Sensors für die *Point-of-care*-Diagnostik mit der spezifischen Lysozym-Detektion erfolgreich gezeigt werden. Dies kann an einer zu geringen Affinität des verwendeten Fragments TOB5-D4 liegen. Dies steht jedoch im Widerspruch zu der gezeigten ausreichend hohen Sensitivität des QCM-Systems. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass in dem verwendeten Serum ebenfalls CRP vorhanden war, das durch das TOB5-D4-scFv-Fragment detektiert wurde. Außerdem könnte es zu einer Kreuzreaktion mit einem anderen Protein gekommen sein. In beiden Fällen wäre es sehr wahrscheinlich, dass alle zur Verfügung stehenden Bindungsstellen der gekoppelten scFv-Fragmente bereits durch Pufferfluss (FCS-PBS-Gemisch) gesättigt waren und somit keine spezifische CRP-Detektion mehr erfolgen konnte. Hierdurch wird die Notwendigkeit einer dem QCM-Sensor vorgeschalteten CRP-Anreicherung verdeutlicht. Dies kann durch die Integration der bereits geplanten Anreicherungszone ermöglicht werden.

V.6 AUSBLICK

Mit den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Antikörperfragmenten sind alle Voraussetzungen für die Integration der Anreicherungszone in das *Lap-on-a-chip*-Gesamtfließsystem erfüllt. Die isolierten konformationellen Binder können zum spezifischen Binden des CRPs aus dem Blutserum eingesetzt werden, wofür allerdings noch eine weitere biochemische Charakterisierung dieser Binder notwendig ist. In der Detektionszone könnten sowohl die Ausgangs-Fragmente LA13-IIE3-scFv und vor allem TOB5-D4-scFv, als auch die mittels Mutagenisierung in ihrer Affinität und Stabilität verbesserten Klone oder die mit Hilfe alternativer Elutionsstrategien isolierten Binder (Popp, 2011) eingesetzt werden, um CRP unter den physikochemischen Bedingungen des Elutionspuffers zu binden. Der zu verwendende Puffer muss in weiteren Experimenten ermittelt werden. Dabei muss das Zusammenspiel der verschiedenen scFv-Fragmente unter den gewählten Bedingungen im Gesamtsystem validiert werden.

Die gerichtete Kopplung der CRP-spezifischen Antikörperfragmente auf der Goldoberfläche mittels SNAP-Tag wurde erstmals gezeigt. Für weitere Untersuchungen muss eine Optimierung der Produktion und Reinigung dieser Fusionsproteine erfolgen.

Die Charakterisierung des QCM-Systems wurde vorangetrieben. Die Sensitivität und Genauigkeit des QCM-Sensors muss weiter erhöht werden, um auch noch geringere CRP-Mengen nachweisen zu können, womit eine frühzeitige Prognose von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ermöglicht würde. Dies könnte zum einen durch weitere gezielte Optimierungen der eingesetzten Antikörperfragmente erfolgen. Andererseits ist eine Verbesserung des QCM-Chips auf mikrotechnischer Ebene u. a. zur Reduzierung des Hintergrundsignals und zur Steigerung der Empfindlichkeit unbedingt notwendig. So könnten die im Vergleich zu anderen, kommerziell erhältlichen QCM-Systemen hohen Frequenzschwankungen (10 Hz) durch Abdichtung und Immobilisierung des Quarzresonators in einer Flüssigkeits-gefüllten Kammer (Sota *et al.*, 2002) und durch Ebnung der rauen Chipoberfläche (Theisen *et al.*, 2004) vermindert werden. Nachdem bereits die spezifische Detektion von Lysozym aus einem Proteingemisch (FCS) gezeigt werden konnte, müssen entsprechende Messungen mit CRP und ggf. vorgeschalteter Anreicherungszone wiederholt werden. In einem weiteren Schritt sollten dann mit CRP angereicherte Blutproben vermessen werden, um das Ziel eines automatisierten, computergestützten Vollblutanalysesystems zur qualitativen Blutserum-Diagnostik zu erreichen.

VI ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

VI.1 ZUSAMMENFASSUNG

Das C-reaktive Protein (CRP) ist einer der wichtigsten Blutserummarker für Entzündungsreaktionen und bakterielle Infektionen. Bisher wird seine Konzentration unter großem Zeit- und Kostenaufwand in medizinischen Laboren mit Hilfe optischer Messmethoden (z. B. Immunturbidimetrie) oder Immunoassays bestimmt. Vor allem in Entwicklungsländern mit häufig mangelnder Infrastruktur aber auch in Industrieländern ist eine einfache, schnelle und kostengünstige *Point-of-care*-Diagnostik von CRP, d. h. direkt am Patienten z. B. während einer Operation oder bei ambulanter Behandlung, wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 etablierte, auf einer Quarzkristallmikrowaage (QCM) basierende *Lab-on-a-chip*-System zur vollautomatisierten mikrofluidischen Trennung von Vollblutproben und nachfolgender CRP-Detektion weiterentwickelt und evaluiert. Zur Steigerung der Sensitivität, Spezifität, Stabilität und Regenerierbarkeit wurden die bereits vorhandenen CRP-spezifischen scFv-Fragmente LA13-IIE3 und TOB5-D4 einerseits in verschiedene Antikörperformate (scAB, scFv-Fc) überführt und andererseits in Genbibliotheken mutagenisiert, um die biochemischen Eigenschaften der Binder gezielt zu verändern. So konnten erfolgreich hoch affine ($2,65 \times 10^{-9}$ M) und extrem stabile (Temperatur, pH, Salz) Antikörperfragmente generiert werden, die sich deutlich von ihren Vorgängern unterscheiden. Diese eignen sich besonders für den Einsatz in der Detektionszelle eines Sensor-Chips, in der sie auf der Goldoberfläche der QCM immobilisiert CRP auch unter teilweise denaturierenden Bedingungen stabil binden können. Mit der Phagen-Display-Methode konnten zusätzlich weitere CRP-spezifische Antikörperfragmente isoliert werden, die ausschließlich konformationelle Epitope des nativen CRP-Moleküls erkennen. Somit sind sie zur Anreicherung des CRPs aus Blutseren in der dem Chip vorgeschalteten Anreicherungszone anwendbar. Die gezielte Immobilisierung der CRP-spezifischen Antikörperfragmente auf Goldoberflächen mittels SNAP-Tag-Fusionsproteinen führt zur Erhöhung der Sensitivität des QCM-Chips. Ferner wurde der QCM-Sensor hinsichtlich Spezifität, Regenerierbarkeit und Anwendungsmöglichkeit in mehrfachen sich wiederholenden Messungen mit verschiedenen Antikörperfragmenten weiter charakterisiert. So konnten mit einem QCM-Sensor bereits über 100 repetitive CRP-Messzyklen durchgeführt werden. Auch konnte die Anwendbarkeit des Systems für die Detektion weiterer Antigene wie Lysozym und BSA mittels verschiedener Antikörper-Formate (scFv, IgG) demonstriert werden. Somit wurden

die Voraussetzungen für die Integration einer Anreicherungszone in das vollautomatisierte, mikrofluidische, QCM-basierte *Lab-on-a-chip*-System erfüllt.

VI.2 SUMMARY

The acute phase protein C-reactive protein (CRP) is one of the most important markers in the blood for inflammation and bacterial infections. Its concentration is currently determined in centralized laboratories with time consuming and cost intensive methods such as turbidimetry or enzyme immunoassay. For this, it is a great demand for a simple, quick, reliable and cost-efficient *Point-of-care* testing (POCT) e. g. during surgeries or as bedside tests in developing but also in industrialized countries.

In this work the further development and evaluation of a micro-fluidic, quartz crystal microbalance (QCM) based *lab-on-a-chip* system for the measurements of whole blood samples are presented. For improvement of the sensitivity, specificity and stability of this special system several strategies were conducted. First off the already existing scFv fragments LA13-IIE3 and TOB5-D4 were successfully converted into different antibody formats (scAb, scFv-Fc) and mutagenized to derive binders with different biochemical properties. Several high affinity (2.65×10^{-9} M) binders were generated which are stable to high temperatures, salt concentrations and extreme pH values. These binders can be immobilized on the sensor chip surface and used for the detection of CRP molecules under denaturing conditions. Secondly, several new CRP specific antibody fragments out of four different antibody gene libraries were obtained via phage display using magnetic beads. The new identified binders are able to bind to conformational epitopes of native CRP molecules. Thus, they can be used for the enrichment of CRP out of the blood serum in an affinity matrix upstream the QCM-chip. Furthermore, directed immobilization of SNAP-tag labeled CRP specific antibody fragments onto gold surfaces could be successfully shown for the first time. By this, the system's sensitivity and specificity could be increased. In addition several different antibody fragments and formats were used for further characterization regarding sensitivity, robustness and regeneration of the QCM-sensor. In repeating measurements a concentration dependant detection of different antigens (CRP, lysozyme and BSA) was shown. Further, the number of possible repeats of the measurement could be demonstrated for several antibody fragments (e.g. CRP-specific TOB5-D4-scFv: > 100 measurement cycles). In addition, the specific antigen detection out of a mixture of unknown composition (FCS) was shown for the first time.

Thus, all necessary requirements for the integration of an affinity enrichment module into the fully-automated, micro-fluidic lab-on-a-chip system for a point-of-care diagnostic of CRP could be shown.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman & S. Pillai (2007). *Cell Mol Immunol* Saunders.
- Aberl, F., C. Kosslinger & H. Wolf (1998). The quartz crystal microbalance (QCM) as an immunosensor. *Methods Mol Med* **13**: 519-529.
- Abgrall, P. & A. M. Gué (2007). Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem-a review. *J Micromech Microengin* **17**: R15-R49.
- Agrawal, A., A. K. Shrive, T. J. Greenhough & J. E. Volanakis (2001). Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* **166**: 3998-4004.
- Aizawa, H., Y. Gokita, J. W. Park, Y. Yoshimi & S. Kurosawa (2006). Antibody immobilization on functional monolayers using a quartz crystal microbalance. *IEEE Sens J* **6**: 1052-1056.
- Al-Halabi, L. (2008). *Rekombinante Antikörper für „Lab-on-chip“*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Balck, A., M. Michalzik, L. Al-Halabi, S. Dübel & S. Büttgenbach (2011). Design and fabrication of a lab-on-a-chip for point-of-care diagnostics. *Sens Transducers J* **127**: 102-111.
- Ballou, S. P. & G. Lozanski (1992). Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* **4**: 361-368.
- Barbas, C. F., 3rd, T. A. Collet, W. Amberg, P. Roben, J. M. Binley, D. Hoekstra, D. Cababa, T. M. Jones, R. A. Williamson & G. R. Pilkington (1993). Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* **230**: 812-823.
- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, R. A. Lerner & S. J. Benkovic (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7978-7982.
- Barna, B. P., K. James & S. D. Deodhar (1987). Activation of human monocyte tumoricidal activity by C-reactive protein. *Cancer Res* **47**: 3959-3963.
- Beghetto, E., A. Pucci, O. Minenkova, A. Spadoni, L. Bruno, W. Buffolano, D. Soldati, F. Felici & N. Gargano (2001). Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *In J Parasitol* **31**: 1659-1668.
- Better, M., C. P. Chang, R. R. Robinson & A. H. Horwitz (1988). *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**: 1041-1043.
- Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan & M. Whitlow (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**: 423-426.
- Black, S., A. Agrawal & D. Samols (2003). The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct. *Mol Immunol* **39**: 1045-1054.

- Black, S., I. Kushner & D. Samols (2004). C-reactive protein. *J Biol Chem* **279**: 48487-48490.
- Blazek, D. & V. Celer (2003). The production and application of single-chain antibody fragments. *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 687-698.
- Blum, H., H. Beier & H. J. Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Breitling & Dübel (1997). *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Breitling, F., S. Dubel, T. Seehaus, I. Klewinghaus & M. Little (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**: 147-153.
- Briand, E., M. Salmain, C. Compere & C. M. Pradier (2007). Anti-rabbit immunoglobulin G detection in complex medium by PM-RAIRS and QCM Influence of the antibody immobilisation method. *Biosens Bioelectron* **22**: 2884-2890.
- Burmester, G. R., A. Pezzutto & E. al. (1998). *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag.
- Burton, D. R., C. F. Barbas, 3rd, M. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock & R. A. Lerner (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10134-10137.
- Cao, H., Y. Xiong, T. Wang, B. Chen, T. C. Squier & M. U. Mayer (2007). A red cy3-based biarsenical fluorescent probe targeted to a complementary binding peptide. *J Am Chem Soc* **129**: 8672-8673.
- Carrigan, S. D., G. Scott & M. Tabrizian (2005). Real-time QCM-D immunoassay through oriented antibody immobilization using cross-linked hydrogel biointerfaces. *Langmuir* **21**: 5966-5973.
- Chasteen, L., J. Ayriss, P. Pavlik & A. R. Bradbury (2006). Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res* **34**: e145.
- Chomean, S., T. Potipitak, C. Promptmas & W. Ittarat (2010). Quartz crystal microbalance-based biosensor for the detection of alpha-thalassemia 1 (SEA deletion). *Clin Chem Lab Med* **48**: 1247-1254.
- Chowdhury, P. S. & I. Pastan (1999). Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation *in vitro*. *Nat Biotechnol* **17**: 568-572.
- Cirino, P. C., K. M. Mayer & D. Umeno (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol Biol* **231**: 3-9.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths & G. Winter (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-628.
- Clyne, B. & J. S. Olshaker (1999). The C-reactive protein. *J Emerg Med* **17**: 1019-1025.

- Coia, G., P. J. Hudson & R. A. Irving (2001). Protein affinity maturation *in vivo* using *E. coli* mutator cells. *J Immunol Methods* **251**: 187-193.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890.
- Correia, L. C., J. C. Lima, G. Gerstenblith, L. P. Magalhaes, A. Moreira, O. Barbosa, Jr., J. Dumet, L. C. Passos, A. D'Oliveira Junior & J. P. Esteves (2003). Correlation between turbidimetric and nephelometric methods of measuring C-reactive protein in patients with unstable angina or non-ST elevation acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* **81**: 133-136, 129-132.
- D'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Cr hebdomadaire Acad. Sci., Paris* **165**: 373-375.
- D'Mello, F. & C. R. Howard (2001). An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *J Immunol Methods* **247**: 191-203.
- Daugherty, P. S., G. Chen, B. L. Iverson & G. Georgiou (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2029-2034.
- de Haard, H. J., N. van Neer, A. Reurs, S. E. Hufton, R. C. Roovers, P. Henderikx, A. P. de Bruijne, J. W. Arends & H. R. Hoogenboom (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J BiolChem* **274**: 18218.
- Derewenda, Z. S. (2004). The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods* **34**: 354-363.
- Dietrich, S. (2011). *Selektion von humanen, rekombinanten Antikörpern gegen NK-Zellrezeptoren mittels Phagen-Display*. Masterarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Dobrinich, R. & P. J. Spagnuolo (1991). Binding of C-reactive protein to human neutrophils. Inhibition of respiratory burst activity. *Arthritis Rheum* **34**: 1031-1038.
- Dominici, R., P. Luraschi & C. Franzini (2004). Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. *J Clin Lab Anal* **18**: 280-284.
- Dong, Q. & J. R. Wright (1996). Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol* **156**: 4815-4820.
- Donovan, R. S., C. W. Robinson & B. R. Glick (1996). Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol* **16**: 145-154.
- Du Clos, T. W. (1989). C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J Immunol* **143**: 2553-2559.
- Du Clos, T. W. & C. Mold (2004). C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res* **30**: 261-277.

- Du Clos, T. W., L. T. Zlock & R. L. Rubin (1988). Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *J Immunol* **141**: 4266-4270.
- Durocher, Y., S. Perret & A. Kamen (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **30**: E9.
- Edelman, G. M. (1973). Antibody structure and molecular immunology. *Science* **180**: 830-840.
- Edelman, G. M. & J. A. Gally (1964). A model for the 7s antibody molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 846-853.
- El-Ali, J., P. K. Sorger & K. F. Jensen (2006). Cells on chips. *Nature* **442**: 403-411.
- Engin, S., V. Trouillet, C. M. Franz, A. Welle, M. Bruns & D. Wedlich (2010). Benzyguanine thiol self-assembled monolayers for the immobilization of SNAP-tag proteins on microcontact-printed surface structures. *Langmuir* **26**: 6097-6101.
- Esposito, S., E. Tremolati, E. Begliatti, S. Bosis, L. Gualtieri & N. Principi (2005). Evaluation of a rapid bedside test for the quantitative determination of C-reactive protein. *Clin Chem Lab Med* **43**: 438-440.
- Ewert, S., A. Honegger & A. Pluckthun (2003). Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry* **42**: 1517-1528.
- Fakhrullin, R. F., V. G. Vinter, A. I. Zamaleeva, M. V. Matveeva, R. A. Kourbanov, B. K. Temesgen, D. G. Ishmuchametova, Z. I. Abramova, O. A. Konovalova & M. K. Salakhov (2007). Quartz crystal microbalance immunosensor for the detection of antibodies to double-stranded DNA. *Anal Bioanal Chem* **388**: 367-375.
- Fermer, C., I. Andersson, K. Nilsson & O. Nilsson (2004). Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling. *Tumour Biol* **25**: 7-13.
- Foote, J. & G. Winter (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol* **224**: 487-499.
- Fromant, M., S. Blanquet & P. Plateau (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **224**: 347-353.
- Galve-de Rochemonteix, B., K. Wiktorowicz, I. Kushner & J. M. Dayer (1993). C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* **53**: 439-445.
- Gautier, A., A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, Jr., M. Kindermann, F. Beaufile & K. Johnsson (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* **15**: 128-136.

- Gershov, D., S. Kim, N. Brot & K. B. Elkon (2000). C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* **192**: 1353-1364.
- Gewurz, H., X. H. Zhang & T. F. Lint (1995). Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* **7**: 54-64.
- Goletz, S., P. A. Christensen, P. Kristensen, D. Blohm, I. Tomlinson, G. Winter & U. Karsten (2002). Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol* **315**: 1087-1097.
- Graff, C. P., K. Chester, R. Begent & K. D. Wittrup (2004). Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Eng Des Sel* **17**: 293-304.
- Griffiths, A. D., M. Malmqvist, J. D. Marks, J. M. Bye, M. J. Embleton, J. McCafferty, M. Baier, K. P. Holliger, B. D. Gorick, N. C. Hughes-Jones & et al. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* **12**: 725-734.
- Haeberle, S. & R. Zengerle (2007). Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* **7**: 1094-1110.
- Hartley, D. L. & J. F. Kane (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **16**: 101-102.
- Hawkins, R. E., S. J. Russell & G. Winter (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* **226**: 889-896.
- Hayashi, N., M. Welschof, M. Zewe, M. Braunagel, S. Dubel, F. Breitling & M. Little (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques* **17**: 310, 312, 314-315.
- Hayhurst, A. (2000). Improved expression characteristics of single-chain Fv fragments when fused downstream of the *Escherichia coli* maltose-binding protein or upstream of a single immunoglobulin-constant domain. *Protein Expr Purif* **18**: 1-10.
- Hengerer, A., C. Kosslinger, J. Decker, S. Hauck, I. Queitsch, H. Wolf & S. Dubel (1999). Determination of phage antibody affinities to antigen by a microbalance sensor system. *BioTechniques* **26**: 956-960, 962, 964.
- Hockney, R. C. (1994). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **12**: 456-463.
- Holliger, P., T. Prospero & G. Winter (1993). "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6444-6448.
- Honegger, A. (2008). Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handb Exp Pharmacol*: 47-68.

- Hong, S. R., H. D. Jeong & S. Hong (2010). QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta* **82**: 899-903.
- Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson & G. Winter (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **19**: 4133-4137.
- Hoogenboom, H. R. & G. Winter (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J Mol Biol* **227**: 381-388.
- Huber, W., S. Perspicace, J. Kohler, F. Muller & D. Schlatter (2004). SPR-based interaction studies with small molecular weight ligands using hAGT fusion proteins. *Anal Biochem* **333**: 280-288.
- Hurlimann, J., G. Thorbecke & G. Hochwald (1966). The liver as the site of C-reactive protein formation. *J exp med* **123**: 365.
- Husebekk, A. & L. Hansson (2000). *C-reaktives Protein in Klinik und Praxis; 1. deutsche Auflage*. Axis Shield PoC AS, Oslo.
- Hust, M., S. Dubel & T. Schirrmann (2007a). Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods Mol Biol* **408**: 243-255.
- Hust, M., T. Jostock, C. Menzel, B. Voedisch, A. Mohr, M. Brenneis, M. I. Kirsch, D. Meier & S. Dubel (2007b). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* **7**: 14.
- Hust, M., E. Maiss, H. J. Jacobsen & T. Reinard (2002). The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J Virol Methods* **106**: 225-233.
- Hust, M., T. Meyer, B. Voedisch, T. Rulker, H. Thie, A. El-Ghezal, M. I. Kirsch, M. Schutte, S. Helmsing, D. Meier, T. Schirrmann & S. Dubel (2011). A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J Biotechnol* **152**: 159-170.
- Huston, J. S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai, J. Novotny, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea & et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5879-5883.
- Irving, R. A., A. A. Kortt & P. J. Hudson (1996). Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology* **2**: 127-143.
- Ito, W., Y. Iba & Y. Kurosawa (1993). Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters. *J Biol Chem* **268**: 16639-16647.
- Janeway, C., K. Murphy, P. Travers & M. Walport (2009). *Janeway Immunologie*, p. 1093. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Janshoff, A., H. J. Galla & C. Steinem (2000). Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors- An Alternative to Optical Biosensors? *Angew Chem Int Ed Engl* **39**: 4004-4032.
- Jialal, I., S. Devaraj & S. K. Venugopal (2004). C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* **44**: 6-11.
- Jiang, Y., Z. Wang, X. Yu, F. Shi, H. Xu, X. Zhang, M. Smet & W. Dehaen (2005). Self-assembled monolayers of dendron thiols for electrodeposition of gold nanostructures: toward fabrication of superhydrophobic/superhydrophilic surfaces and pH-responsive surfaces. *Langmuir* **21**: 1986-1990.
- Johnson, K. S. & R. E. Hawkins (1996). Affinity maturation of antibodies using phage display. In: *Antibody engineering : A Practical Approach*. J. McCafferty, H. R. Hoogenboom & D. J. Chiswell (eds). Oxford ; New York: Irl Press at Oxford University Press, pp. 41-58.
- Jung, S., A. Honegger & A. Pluckthun (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol* **294**: 163-180.
- Jung, S., S. Spinelli, B. Schimmele, A. Honegger, L. Pugliese, C. Cambillau & A. Pluckthun (2001). The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains. *J Mol Biol* **309**: 701-716.
- Kampmeier, F., M. Ribbert, T. Nachreiner, S. Dembski, F. Beaufils, A. Brecht & S. Barth (2009). Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase. *Bioconjug Chem* **20**: 1010-1015.
- Kaplan, M. H. & J. E. Volanakis (1974). Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol* **112**: 2135-2147.
- Kato, T., K. Sato, S. Suzuki, H. Sasakawa, M. Kurokawa, K. Nishioka & K. Yamamoto (1995). Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions. *Mol Biol Rep* **21**: 141-146.
- Kenanova, V. & A. M. Wu (2006). Tailoring antibodies for radionuclide delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **3**: 53-70.
- Keppler, A., M. Kindermann, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel & K. Johnsson (2004). Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules *in vivo* and *in vitro*. *Methods* **32**: 437-444.
- Kilpatrick, J. M. & J. E. Volanakis (1991). Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. *Immunol Res* **10**: 43-53.
- Kim, S. H., Y. S. Lee, S. Y. Hwang, G. W. Bae, K. Nho, S. W. Kang, Y. G. Kwak, C. S. Moon, Y. S. Han, T. Y. Kim & W. G. Kho (2007). Effects of PEGylated scFv antibodies against Plasmodium vivax duffy binding protein on the biological activity and stability *in vitro*. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 1670-1674.

- Kindermann, M., N. George, N. Johnsson & K. Johnsson (2003). Covalent and selective immobilization of fusion proteins. *J Am Chem Soc* **125**: 7810-7811.
- Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer & M. Little (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J Immunol Methods* **200**: 69-77.
- Kirsch, M. I., B. Hulseweh, C. Nacke, T. Rulker, T. Schirrmann, H. J. Marschall, M. Hust & S. Dubel (2008). Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *BMC Biotechnol* **8**: 66.
- Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellnhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun & B. Virnekas (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J mol biol* **296**: 57-86.
- Koenig, W., M. Sund, M. Frohlich, H. G. Fischer, H. Lowel, A. Doring, W. L. Hutchinson & M. B. Pepys (1999). C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* **99**: 237-242.
- Kohler, G. & C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Komissarov, A. A., M. T. Marchbank, M. J. Calcutt, T. P. Quinn & S. L. Deutscher (1997). Site-specific mutagenesis of a recombinant anti-single-stranded DNA Fab. Role of heavy chain complementarity-determining region 3 residues in antigen interaction. *J Biol Chem* **272**: 26864-26870.
- Kramer, K., M. Fiedler, A. Skerra & B. Hock (2002). A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F(ab) fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. *Biosens Bioelectron* **17**: 305-313.
- Krauss, J., M. A. Arndt, Z. Zhu, D. L. Newton, B. K. Vu, V. Choudhry, R. Darbha, X. Ji, N. S. Courtenay-Luck, M. P. Deonarin, J. Richards & S. M. Rybak (2004). Impact of antibody framework residue VH-71 on the stability of a humanised anti-MUC1 scFv and derived immunoenzyme. *Br J Cancer* **90**: 1863-1870.
- Krykbaev, R. A., W. R. Liu, P. D. Jeffrey & M. N. Margolies (2001). Phage display-selected sequences of the heavy-chain CDR3 loop of the anti-digoxin antibody 26-10 define a high affinity binding site for position 16-substituted analogs of digoxin. *J Biol Chem* **276**: 8149-8158.
- Kufer, S. K., H. Dietz, C. Albrecht, K. Blank, A. Kardinal, M. Rief & H. E. Gaub (2005). Covalent immobilization of recombinant fusion proteins with hAGT for single molecule force spectroscopy. *Eur Biophys J* **35**: 72-78.
- Kurosawa, S., H. Aizawa, M. Tozuka & E. al. (2003a). Immunosensors using a quartz crystal microbalance. *Meas Sci Technol* **14**: 1882-1887.

- Kurosawa, S., H. Aizawa, M. Tozuka, M. Nakamura & J. W. Park (2003b). Immunosensors using a quartz crystal microbalance. *Meas Sci Technol* **14**: 1882.
- Kurosawa, S., H. Aizawa & M. Yoshimoto (2000). Latex piezoelectric immunoassay: analysis of C-reactive protein in human serum. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **47**: 1256-1258.
- Kurosawa, S., M. Nakamura, J. W. Park, H. Aizawa, K. Yamada & M. Hirata (2004). Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. *Biosens Bioelectron* **20**: 1134-1139.
- Kushner, I. (2001). C-reactive protein elevation can be caused by conditions other than inflammation and may reflect biologic aging. *Cleve Clin J Med* **68**: 535-537.
- Kushner, I. & G. Feldmann (1978). Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med* **148**: 466-477.
- Kuta, A. E. & L. L. Baum (1986). C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* **164**: 321-326.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lei, K. J., T. Liu, G. Zon, E. Soravia, T. Y. Liu & N. D. Goldman (1985). Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. *J Biol Chem* **260**: 13377-13383.
- Leonard, P., P. Safsten, S. Hearty, B. McDonnell, W. Finlay & R. O'Kennedy (2007). High throughput ranking of recombinant avian scFv antibody fragments from crude lysates using the Biacore A100. *J Immunol Methods* **323**: 172-179.
- Levy, R., I. J. Molineux, B. L. Iverson & G. Georgiou (2007). Isolation of trans-acting genes that enhance soluble expression of scFv antibodies in the *E. coli* cytoplasm by lambda phage display. *J Immunol Methods* **321**: 164-173.
- Li, D., J. Wang, R. Wang, Y. Li, D. Abi-Ghanem, L. Berghman, B. Hargis & H. Lu (2011). A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1. *Biosens Bioelectron* **26**: 4146-4154.
- Liekefett, M., J. Rabe, S. Buttgenbach, J. Wendler & U. Bilitewski (2003). Miniaturised quartz crystal microbalance (QCM) array for immunosensor application. *MICRO.tec*: 299-304.
- Love, J. C., L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo & G. M. Whitesides (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev* **105**: 1103-1169.
- Low, N. M., P. H. Holliger & G. Winter (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* **260**: 359-368.

- Macintyre, S., D. Samols & P. Dailey (1994). Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. *J Biol Chem* **269**: 24496-24503.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538.
- Marks, J. D., A. D. Griffiths, M. Malmqvist, T. P. Clackson, J. M. Bye & G. Winter (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y)* **10**: 779-783.
- Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths & G. Winter (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**: 581-597.
- Marnell, L. L., C. Mold, M. A. Volzer, R. W. Burlingame & T. W. Du Clos (1995). C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. *J Immunol* **155**: 2185-2193.
- Marschall, A. (2011). *Persönliche Gabe*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Martineau, P. (2002). Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. *Methods Mol Biol* **178**: 287-294.
- Marvin, D. A. (1998). Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 150-158.
- McBride, J. D. & M. A. Cooper (2008). A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-reactive protein employing acoustic biosensing. *J Nanobiotechnol* **6**: 5.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter & D. J. Chiswell (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.
- McCarty, M. (1982). Historical perspective on C-reactive protein. *Ann N Y Acad Sci* **389**: 1-10.
- McGregor, D. P., P. E. Molloy, C. Cunningham & W. J. Harris (1994). Spontaneous assembly of bivalent single chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Mol Immunol* **31**: 219-226.
- Michaelsen, T. E. & J. B. Natvig (1972). Three new fragments, F(ab) 2 , F(c) 2 , and Fab-c, obtained by papain proteolysis of normal human IgG. *Scand J Immunol* **1**: 255-268.
- Michalzik, M. (2008). *Entwicklung eines mikrofluidischen Analysesystems zum immunologischen Proteinnachweis*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Michalzik, M., J. Wendler, J. Rabe, S. Büttgenbach & U. Bilitewski (2005a). Development and application of a miniaturised quartz crystal microbalance (QCM) as immunosensor for bone morphogenetic protein-2. *Sensors and Actuators B: Chemical* **105**: 508-515.
- Michalzik, M., R. Wilke & S. Büttgenbach (2005b). Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application in liquid. *Euroensors XVIII 2004 - The 18th European Conference on Solid-State Transducers* **110**: 410-415.

- Missiakas, D. & S. Raina (1997). Protein folding in the bacterial periplasm. *J Bacteriol* **179**: 2465-2471.
- Mold, C., H. Gewurz & T. W. Du Clos (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* **42**: 23-30.
- Mold, C., M. Kingzette & H. Gewurz (1984). C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b. *J Immunol* **133**: 882-885.
- Mold, C., W. Rodriguez, B. Rodic-Polic & T. W. Du Clos (2002). C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *J Immunol* **169**: 7019-7025.
- Monsellier, E. & H. Bedouelle (2006). Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. *J Mol Biol* **362**: 580-593.
- Moutel, S., A. El Marjou, O. Vielemeyer, C. Nizak, P. Benaroch, S. Dübel & F. Perez (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol* **9**: 14.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich (1992). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17-27.
- Neubig, B. & W. Briese (1997). *Das grosse Quarz-Kochbuch Quarze, Quarzoszillatoren, Quarz- und Oberflächenwellenfilter (SAW), Messtechnik ; mit 23 Tabellen*, p. 383 S. Franzis, Feldkirchen.
- Nguyen, A. W. & P. S. Daugherty (2003). Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains. *Methods Mol Biol* **231**: 39-44.
- Nguyen, N.-T. (2004). *Mikrofluidik Entwurf, Herstellung und Charakterisierung ; mit 12 Tabellen und 37 Beispielen*, p. XIV, 256 S. Teubner, Stuttgart u.a.
- Palmer, E., H. Liu, F. Khan, M. J. Taussig & M. He (2006). Enhanced cell-free protein expression by fusion with immunoglobulin Ckappa domain. *Protein Sci* **15**: 2842-2846.
- Pande, J., M. M. Szewczyk & A. K. Grover (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* **28**: 849-858.
- Park, J., S. Kurosawa, J. Watanabe & K. Ishihara (2004). Evaluation of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymeric nanoparticle for immunoassay of C-reactive protein detection. *Anal Chem* **76**: 2649-2655.
- Park, S. G., J. S. Lee, E. Y. Je, I. J. Kim, J. H. Chung & I. H. Choi (2000). Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 553-557.
- Park, S. S., J. Kim, J. F. Brandts & H. J. Hong (2003). Stability of murine, chimeric and humanized antibodies against pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus. *Biologicals* **31**: 295-302.

- Parmley, S. F. & G. P. Smith (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-318.
- Pavoni, E., M. Flego, M. L. Dupuis, S. Barca, F. Petronzelli, A. M. Anastasi, V. D'Alessio, A. Pelliccia, P. Vaccaro, G. Monteriu, A. Ascione, R. De Santis, F. Felici, M. Cianfriglia & O. Minenkova (2006). Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* **6**: 41.
- Pepys, M. B. & G. M. Hirschfield (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* **111**: 1805-1812.
- Pini, A., F. Viti, A. Santucci, B. Carnemolla, L. Zardi, P. Neri & D. Neri (1998). Design and use of a phage display library. *J BiolChem* **273**: 21769.
- Popp, I. (2011). *Identifizierung rekombinanter Antikörper gegen C-reaktives Protein für ein Lab-on-a-chip-System*. Masterarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Potempa, L. A., J. N. Siegel, B. A. Fiedel, R. T. Potempa & H. Gewurz (1987). Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol Immunol* **24**: 531-541.
- Potipitak, T., W. Ngrenngarmkert, C. Promptmas, S. Chomean & W. Ittarat (2011). Diagnosis and genotyping of *Plasmodium falciparum* by a DNA biosensor based on quartz crystal microbalance (QCM). *Clin Chem Lab Med* **49**: 1367-1373.
- Povoa, P., E. Almeida & P. Moreira (1998). C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med* **24**: 1052-1056.
- Powers, D. B., P. Amersdorfer, M. Poul, U. B. Nielsen, M. R. Shalaby, G. P. Adams, L. M. Weiner & J. D. Marks (2001). Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **251**: 123-135.
- Rabe, J., J. Schröder, S. Büttgenbach & P. Hauptmann (2003). Monolithic miniaturized quartz microbalance array and its application to chemical sensor systems for liquids. *IEEE Sens J* **3**: 361-368.
- Ray, D. S., H. P. Bscheider & P. H. Hofschneider (1966). Replication of the single-stranded DNA of the male-specific bacteriophage M13. Isolation of intracellular forms of phage-specific DNA. *J Mol Biol* **21**: 473-483.
- Reavy, B., A. Ziegler, J. Diplexcito, S. M. Macintosh, L. Torrance & M. Mayo (2000). Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expr Purif* **18**: 221-228.
- Retter, I., H. H. Althaus, R. Munch & W. Muller (2005). VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res* **33**: D671-674.
- Rondot, S., J. Koch, F. Breitling & S. Dubel (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* **19**: 75-78.

- Roskos, L., S. Klakamp, M. Liang, R. Arends & L. Green (2007). Molecular Engineering II: Antibody Affinity. In: *Handbook of Therapeutic Antibodies*. S. Dübel (ed). Weinheim: Wiley-VCH, pp. 145-169.
- Rülker, T. (2011). *Persönliche Gabe*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Sambrook, J., E. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory press. New York: 931-957.
- Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **155**: 206-222.
- Schier, R., J. Bye, G. Apell, A. McCall, G. P. Adams, M. Malmqvist, L. M. Weiner & J. D. Marks (1996). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol* **255**: 28-43.
- Schier, R. & J. D. Marks (1996). Efficient *in vitro* affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. *Hum Antibodies Hybridomas* **7**: 97-105.
- Schofield, K., F. Voulgari, D. Gozzard, M. Leyland, N. Beeching & J. Stuart (1982). C-reactive protein concentration as a guide to antibiotic therapy in acute leukaemia. *J clin pathol* **35**: 866.
- Schütte, M., P. Thullier, T. Pelat, X. Wezler, P. Rosenstock, D. Hinz, M. I. Kirsch, M. Hasenberg, R. Frank, T. Schirrmann, M. Gunzer, M. Hust & S. Dubel (2009). Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PloS one* **4**: e6625.
- Sharon, J. (1990). Structural correlates of high antibody affinity: three engineered amino acid substitutions can increase the affinity of an anti-p-azophenylarsonate antibody 200-fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4814-4817.
- Shen, Z., H. Yan, Y. Zhang, R. L. Mernaugh & X. Zeng (2008). Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Anal Chem* **80**: 1910-1917.
- Shine, B., F. C. de Beer & M. B. Pepys (1981). Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta* **117**: 13-23.
- Simmons, L. C., D. Reilly, L. Klimowski, T. S. Raju, G. Meng, P. Sims, K. Hong, R. L. Shields, L. A. Damico, P. Rancatore & D. G. Yansura (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods* **263**: 133-147.
- Simmons, L. C. & D. G. Yansura (1996). Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **14**: 629-634.
- Sinclair, A. M. & S. Elliott (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* **94**: 1626-1635.
- Skerra, A. & A. Pluckthun (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**: 1038-1041.

- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1317.
- Soltes, G., M. Hust, K. K. Ng, A. Bansal, J. Field, D. I. Stewart, S. Dubel, S. Cha & E. J. Wiersma (2007). On the influence of vector design on antibody phage display. *J Biotechnol* **127**: 626-637.
- Sota, H., H. Yoshimine, R. F. Whittier, M. Gotoh, Y. Shinohara, Y. Hasegawa & Y. Okahata (2002). A versatile planar QCM-based sensor design for nonlabeling biomolecule detection. *Anal Chem* **74**: 3592-3598.
- Stein, M. P., J. C. Edberg, R. P. Kimberly, E. K. Mangan, D. Bharadwaj, C. Mold & T. W. Du Clos (2000). C-reactive protein binding to FcγRIIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Clin Invest* **105**: 369-376.
- Steipe, B., B. Schiller, A. Pluckthun & S. Steinbacher (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J Mol Biol* **240**: 188-192.
- Stemmer, W. P. (1994a). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10747-10751.
- Stemmer, W. P. (1994b). Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Storri, S., T. Santoni, M. Minunni & M. Mascini (1998). Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. *Biosens Bioelectron* **13**: 347-357.
- Szalai, A. J., M. A. McCrory, G. S. Cooper, J. Wu & R. P. Kimberly (2002). Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun* **3**: 14-19.
- Tebo, J. M. & R. F. Mortensen (1991). Internalization and degradation of receptor bound C-reactive protein by U-937 cells: induction of H₂O₂ production and tumoricidal activity. *Biochim Biophys Acta* **1095**: 210-216.
- Tejani, N. R., T. Chonmaitree, D. K. Rassin, V. M. Howie, M. J. Owen & A. S. Goldman (1995). Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media. *Pediatrics* **95**: 664.
- Theisen, L. A., S. J. Martin & A. R. Hillman (2004). A model for the quartz crystal microbalance frequency response to wetting characteristics of corrugated surfaces. *Anal Chem* **76**: 796-804.
- Thie, H., L. Toleikis, J. Li, R. von Wasielowski, G. Bastert, T. Schirrmann, I. T. Esteves, C. K. Behrens, B. Fournes, N. Fournier, C. de Romeuf, M. Hust & S. Dübel (2011). Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PLoS one* **6**: e15921.
- Thie, H., B. Voedisch, S. Dubel, M. Hust & T. Schirrmann (2009). Affinity maturation by phage display. *Methods Mol Biol* **525**: 309-322, xv.
- Thompson, D., M. B. Pepys & S. P. Wood (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**: 169-177.

- Tilg, H., E. Vannier, G. Vachino, C. A. Dinarello & J. W. Mier (1993). Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* **178**: 1629-1636.
- Venugopal, S. K., S. Devaraj, I. Yuhanna, P. Shaul & I. Jialal (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* **106**: 1439-1441.
- Verma, S., M. A. Kuliszewski, S. H. Li, P. E. Szmitko, L. Zucco, C. H. Wang, M. V. Badiwala, D. A. Mickle, R. D. Weisel, P. W. Fedak, D. J. Stewart & M. J. Kutryk (2004). C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* **109**: 2058-2067.
- Vieira, J. & J. Messing (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* **153**: 3-11.
- Vigushin, D. M., M. B. Pepys & P. N. Hawkins (1993). Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* **91**: 1351-1357.
- Vikholm-Lundin, I. & W. M. Albers (2006). Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein. *Biosens Bioelectron* **21**: 1141-1148.
- Voet, D., J. G. Voet, C. W. Pratt & A. G. Beck-Sickinger (2002). *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH.
- Volanakis, J. E. (1982). Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* **389**: 235-250.
- Volanakis, J. E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* **38**: 189-197.
- von Behring, E. & S. Kitasato (1890). Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*.
- Ward, M. D. & D. A. Buttry (1990). In situ interfacial mass detection with piezoelectric transducers. *Science* **249**: 1000-1007.
- Webster, R. (2001). Filamentous phage biology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Willats, W. G. (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* **50**: 837-854.
- Willuda, J., A. Honegger, R. Waibel, P. A. Schubiger, R. Stahel, U. Zangemeister-Wittke & A. Pluckthun (1999). High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* **59**: 5758-5767.

- Wolbink, G. J., M. C. Brouwer, S. Buysmann, I. J. ten Berge & C. E. Hack (1996). CRP-mediated activation of complement *in vivo*: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *J Immunol* **157**: 473-479.
- Worn, A. & A. Pluckthun (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* **305**: 989-1010.
- Wu, T. T. & E. A. Kabat (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* **132**: 211-250.
- Wulfig, C. & A. Pluckthun (1994). Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**: 685-692.
- Xia, Y. & G. M. Whitesides (1998). Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition* **37**: 550-575.
- Yager, P., T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam & B. H. Weigl (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* **442**: 412-418.
- Yang, G. H., S. O. Yoon, M. H. Jang & H. J. Hong (2007). Affinity maturation of an anti-hepatitis B virus PreS1 humanized antibody by phage display. *J Microbiol* **45**: 528-533.
- Yang, W. P., K. Green, S. Pinz-Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton & C. F. Barbas, 3rd (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol* **254**: 392-403.
- Yau, K. Y., G. Dubuc, S. Li, T. Hiram, C. R. Mackenzie, L. Jermutus, J. C. Hall & J. Tanha (2005). Affinity maturation of a V(H)H by mutational hotspot randomization. *J Immunol Methods* **297**: 213-224.
- Ying, S. C., H. Gewurz, C. M. Kinoshita, L. A. Potempa & J. N. Siegel (1989). Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *J Immunol* **143**: 221-228.
- Yue, C. C. & J. Muller-Greven (1996). Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*
- Zaccolo, M. & E. Gherardi (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on *in vitro* protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J Mol Biol* **285**: 775-783.
- Zegenhagen, L. (2011). *Optimierung der Antikörperbindung an Gold*. Bachelorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Zeller, J. M., A. L. Landay, T. F. Lint & H. Gewurz (1986). Enhancement of human peripheral blood monocyte respiratory burst activity by aggregated C-reactive protein. *J Leukoc Biol* **40**: 769-783.

A ANHANG

VEKTORKARTEN

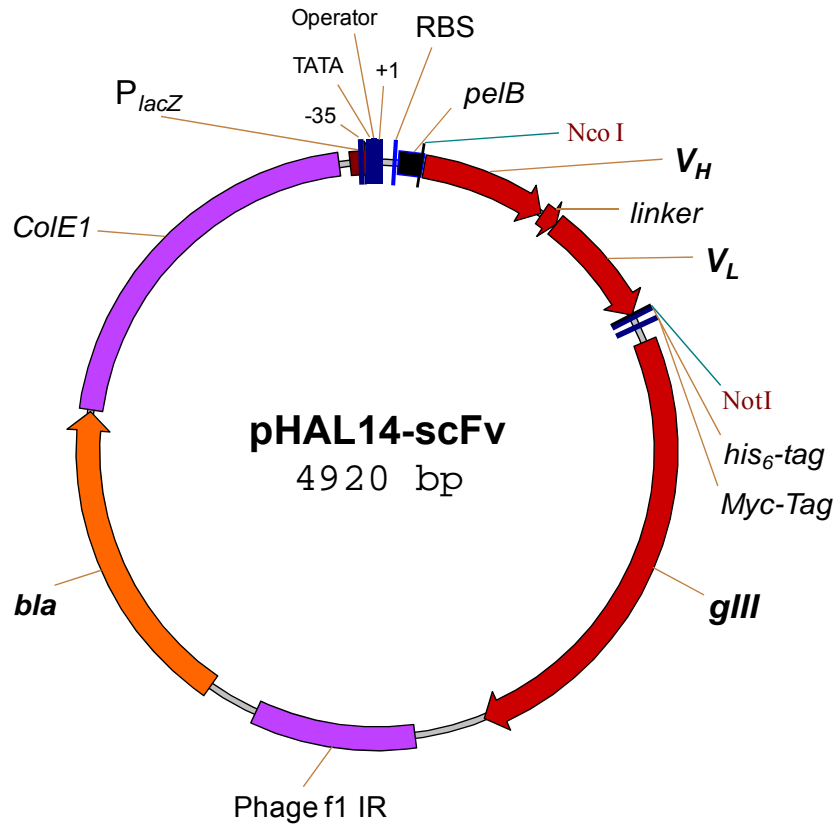


Abbildung A.1: Vektorkarte des Phagemids pHAL14-scFv.

Der Phagemidvektor für die Selektion von scFv-Fragmenten enthält folgende Elemente: LacZ-Promotor (P_{lacZ}) mit funktionellen Elementen (-35, TATA, Operator, +1); Ribosomenbindestelle (RBS); *pelB*-Signalsequenz; Gene, die für die variable Region der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette des scFv-Fragments, das Phagen-Hüllprotein PIII (*gIII*) und die β -Laktamase (*bla*) kodieren. Weiter sind die kodierenden Bereiche für den Peptidlinker (*linker*), den His₆- und Myc-Tag, sowie die u. a. für die Verpackung notwendige *Phage f1 intergenic region* (Phage f1 IR) und der Replikationsursprung für *E. coli* (*ColE1*) dargestellt. Über die Schnittstellen NcoI/NotI erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

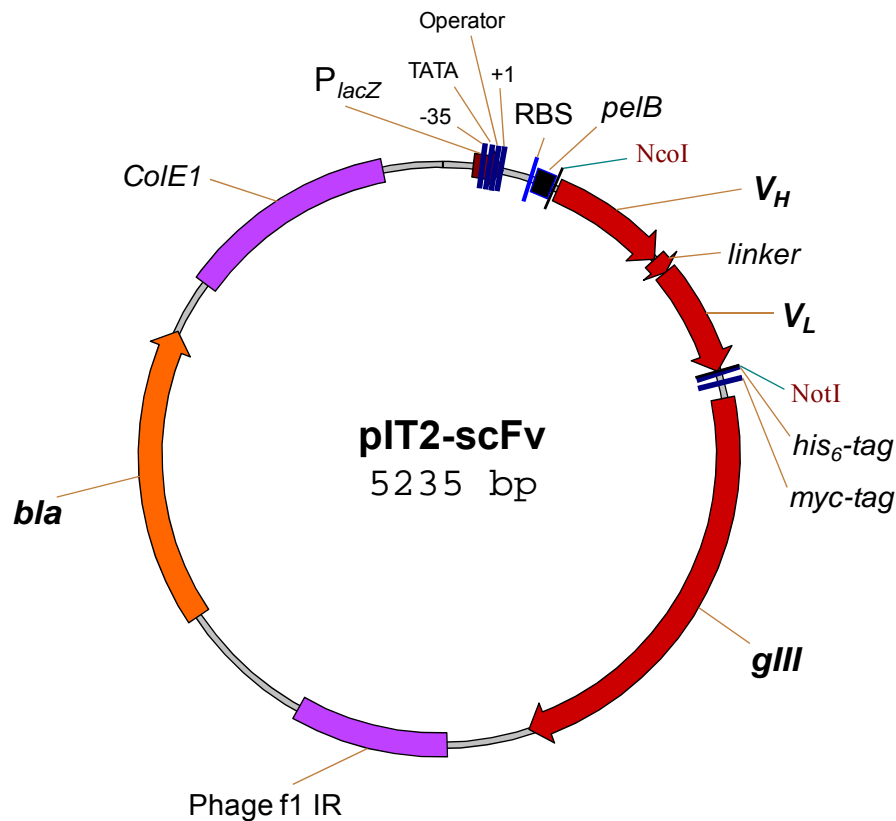


Abbildung A.2: Vektorkarte des Phagemids pIT2-scFv.

Der Phagemidvektor für die Selektion von scFv-Fragmenten enthält folgende Elemente: LacZ-Promotor (P_{lacZ}) mit funktionellen Elementen (-35, TATA, Operator, +1); Ribosomenbindestelle (RBS); *pelB*-Signalsequenz; Gene, die für die variable Region der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des scFv-Fragments, das Phagen-Hüllprotein PIII (*gIII*) und die β -Laktamase (*bla*) kodieren. Weiter sind die kodierenden Bereiche für den Peptidlinker (*linker*), den His₆- und Myc-Tag (*his₆-tag*, *myc-tag*), sowie die u. a. für die Verpackung notwendige *Phage f1 intergenic region* (Phage f1 IR) und der Replikationsursprung für *E. coli* (*ColE1*) dargestellt. Über die Schnittstellen *NcoI*/*NotI* erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

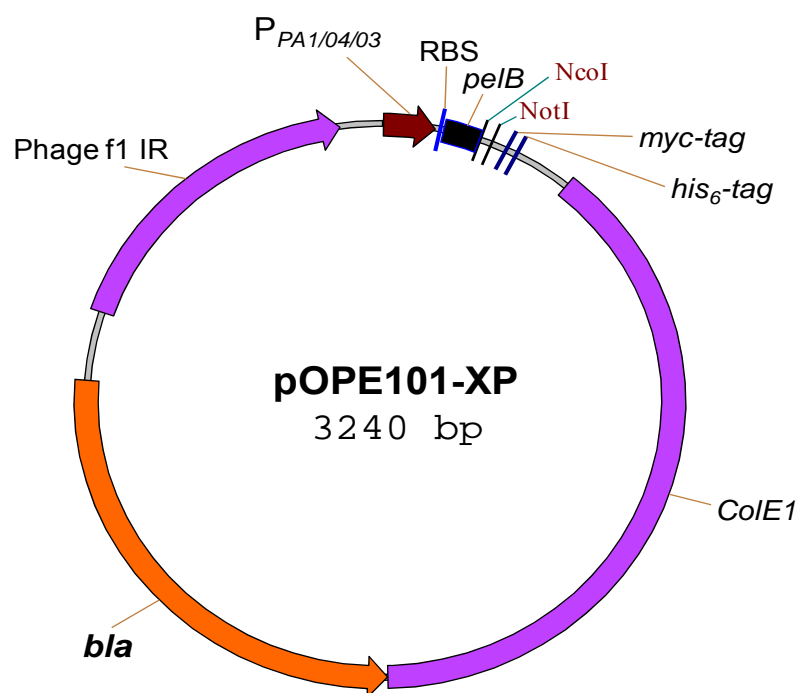


Abbildung A.3: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE101-XP.

Der scFv-Expressionsvektor enthält folgende Elemente: Promotor PA1/04/03 (Variante des LacZ-Promotors, $P_{PA1/04/03}$); Ribosomenbindestelle (RBS); *pelB*-Signalsequenz; das für die β -Laktamase kodierende Gen (*bla*). Weiter sind die kodierenden Bereiche für den His₆- und Myc-Tag (*his₆-tag*, *myc-tag*), sowie die u. a. für die Verpackung notwendige *Phage f1 intergenic region* (Phage f1 IR) und der Replikationsursprung für *E. coli* (*ColE1*) dargestellt. Über die Schnittstellen *NcoI/NotI* erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

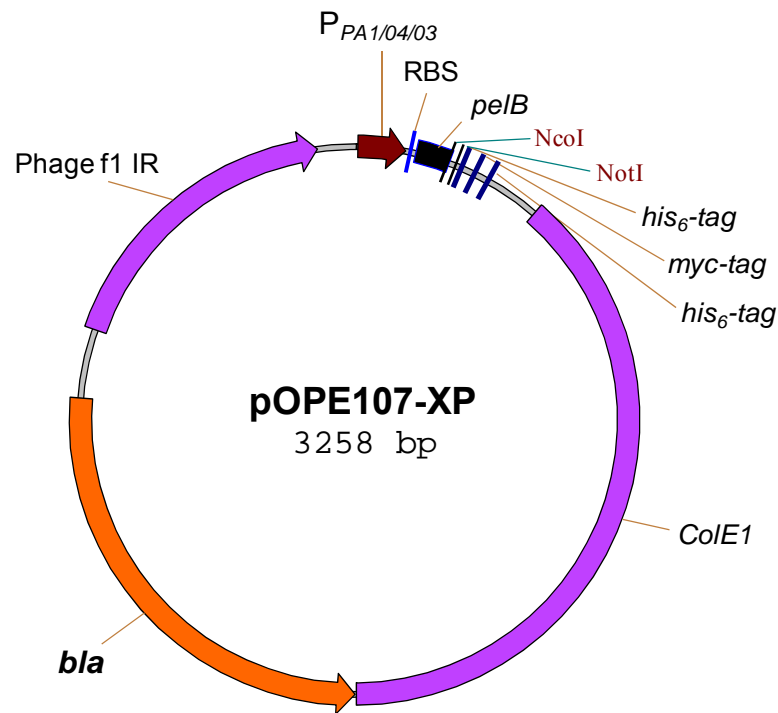


Abbildung A.4: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE107-XP.
 Der scFv-Expressionsvektor enthält folgende Elemente: Promotor PA1/04/03 ($P_{PA1/04/03}$); Ribosomenbindestelle (RBS); *pelB*-Signalsequenz; das für die β -Laktamase kodierende Gen (*bla*). Weiter sind die kodierenden Bereiche für den 2fachen His₆- und Myc-Tag (*his₆-tag*, *myc-tag*), sowie die u. a. für die Verpackung notwendige *Phage f1 intergenic region* (Phage f1 IR) und der Replikationsursprung für *E. coli* (*ColE1*) dargestellt. Über die Schnittstellen *NcoI*/*NotI* erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

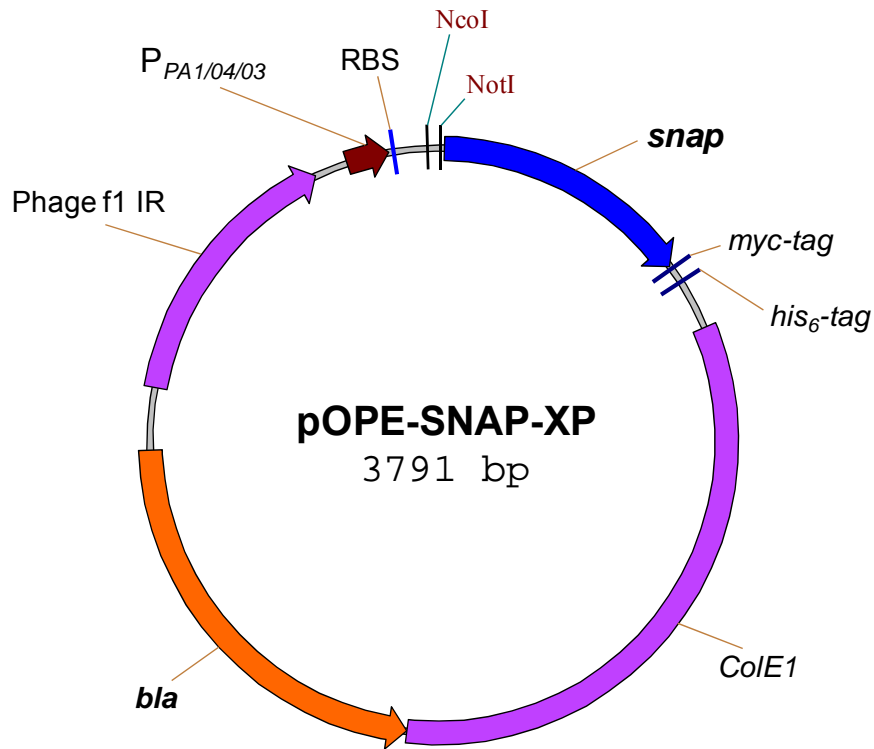


Abbildung A.5: Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pOPE-SNAP-XP.

Der scFv-SNAP-Expressionsvektor enthält folgende Elemente: Promotor PA1/04/03 ($P_{PA1/04/03}$); Ribosombindestelle (RBS); *peIB*-Signalsequenz; Gene, die für den SNAP-Tag (*snap*) sowie die β -Laktamase (*bla*) kodieren. Weiter sind die kodierenden Bereiche für den und His₆- und Myc-Tag (*his₆-tag*, *myc-tag*), sowie die u. a. für die Verpackung notwendige *Phage f1 intergenic region* (Phage f1 IR) und der Replikationsursprung für *E. coli* (*ColE1*) dargestellt. Über die Schnittstellen NcoI/NotI erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

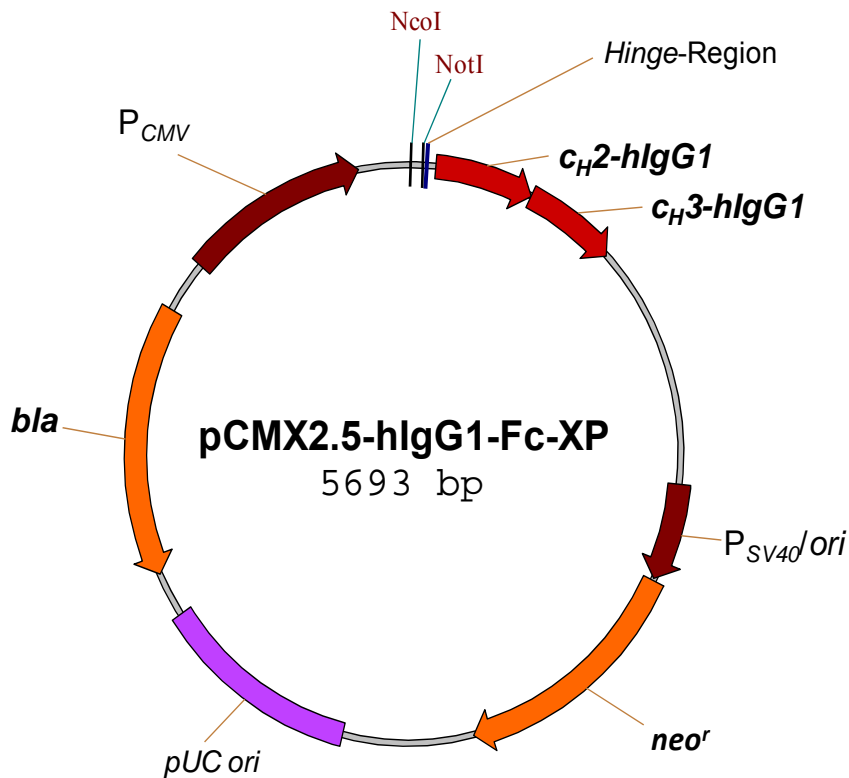


Abbildung A.6: Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pCMX2.5-hlgG1-Fc-XP.

Der scFv-hlgG1-Fc-Expressionsvektor enthält folgende Elemente: CMV-Promotor (P_{CMV}); flexible Gelenkregion (*Hinge-Region*); Gene, die für die konstanten Domänen (c_{H2} -hlgG1 und c_{H3}) des humanen Immunglobulin-Gamma-1-Fc-Teils, die Neomycin-Resistenz (neo^r) und die β -Laktamase (bla) kodieren. Weiter sind ein Transkriptions-Regulierungselement (P_{SV40}/ori) und der Replikationsstartpunkt des Polyomavirus ($pUC\ ori$) dargestellt. Über die Schnittstellen NcoI/NotI erfolgt die Subklonierung von Genen für scFv-Fragmente.

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen auf verschiedenste Weise beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung sowie für die Übernahme des Hauptreferats.

Bei Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

Prof. Dr. Christoph Wittmann danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

PD Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann danke ich für die vielen (fachlichen) Diskussion und Ratschläge. Mein besonderer Dank für die ständige intensive Betreuung, die große Hilfsbereitschaft sowie die Korrekturen an der schriftlichen Ausfertigung meiner Arbeit gilt Dr. André Frenzel. Danke, dass Du immer Zeit und ein offenes Ohr hattest.

Bei Herrn Prof. Dr. Büttgenbach und vor allem Dr. Anne Black vom Institut für Mikrotechnik der TU Braunschweig möchte ich mich für die Generierung der Quarzsensoren und die sehr gute Kooperation im Teilprojekt D2 des Sonderforschungsbereichs 578 bedanken. Allen anderen Teilnehmern des SFB578 danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt auch meinen Bachelor-Studenten Loreen Zegenhagen und David Havlik sowie meiner Master-Studentin Isabell Popp für die praktische Unterstützung bei den Experimenten und die fleißige Mitarbeit am Projekt. Den anderen Mitgliedern des C-Labors danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und die allzeit gute Stimmung im Labor.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Biotechnologie danke ich für die einzigartige, tolle und freundliche Arbeitsatmosphäre und die schönen Zeiten auch außerhalb des Labors.

Bei den Mitgliedern des PSS und vor allem bei Meirei möchte ich mich für die vielen Gespräche und aufmunternden Worte auch abseits des Laboralltags bedanken.

Außerdem danke ich Dr. Rebekka Biedendieck vielmals für ihre Hilfsbereitschaft beim Entstehen dieser Arbeit und ihre unendliche Geduld (am Telefon).

Vielen Dank auch an meine Freunde, die mich immer unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte und kann. Auch danke ich den zahlreichen Mitgliedern (Martin,

Simon, Hannes, Lars, Isam, Malte, Frank, Tristan, Patrick und viele weitere mehr) der Pokerrunde für die vielen unterhaltsamen Abende. Schade, dass diese schöne Zeit vorbei ist.

Mein größter Dank geht an meine Familie für ihre Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit. Danke, dass Ihr immer für mich da ward und seid.

Vanessa, danke für Dein Zuhören, Deine Ratschläge und Deine Geduld vor allem in den letzten Wochen dieser Arbeit. Ich bin sehr froh, dass es Dich gibt.